DIE DEGRADIERUNG LINEARER UND ZIRKULÄRER DNA-MOLEKÜLE DURCH DAS **recBC** ENZYM VON **ESCHERICHIA COLI** UND DIE BEEINFLUSSUNG DER DEGRADIERUNG DURCH DAS **recA** PROTEIN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

ANGELIKA PRELL

geboren in Essen

Bochum 1981

DIE DEGRADIERUNG LINEARER UND ZIRKULÄRER DNA-MOLEKÜLE DURCH DAS **recBC** ENZYM VON **ESCHERICHIA COLI** UND DIE BEEINFLUSSUNG DER DEGRADIERUNG DURCH DAS **recA** PROTEIN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

ANGELIKA PRELL

geboren in Essen

Bochum 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
1.	Das recBC Enzym von E. coli	2
2.	Das recA Protein von E. coli	8
II.	Problemstellung	15
III.	Material und Methoden	
1.	Chemikalien	17
2.	Bakterien- und Phagenstämme	17
3.	Enzyme	18
3.1	recBC Enzym	18
3.2	recA Protein	19
3.3	Exonuklease III	20
3.4	Exonuklease I	21
3.5	S1-Nuklease	21
3.6	λ Exonuklease	21
3.7	T4 Polynukleotid-Ligase	22
4.	Isolierung und radioaktive Markierung von Bakteriophagen DNA	22
4.1	P22 DNA	22
4.2	PM2 DNA	22
4.3	T7 DNA	23
4.4	λ DNA	23
4.5	fd DNA	24
5.	Präparation von DNA-Substraten für das recBC Enzym und das recA Protein	24
5.1	PM2 DNA mit Einzelstrang-Lücken	24
5.2	P22 DNA mit einzelsträngigen Enden	25
5.3	Einzelsträngige lineare DNA	26
5.4	Fragmentierung von doppelsträngiger DNA durch Scherung	27
6.	Bestimmung der säurelöslichen Nukleotide	27
7.	Enzymteste	
7.1	Messung der DNase Aktivität des recBC Enzyms	28
7.2	Filterbindungstest	29

7.3 ATPase Test 29
7.4 Testbedingungen für S1-Nuklease 30
7.5 Ligase-Behandlung von P22 DNA mit Einzelstrangbrüchen 30
7.6 Endonuklease-Test 30
7.7 Messung der enzymatischen Aktivitäten des recA Proteins 31
7.8 Bedingungen zur Bildung von Komplexen aus recA Protein und DNA und anschließender Degradierung der DNA durch das recBC Enzym 32
8. Saccharosegradienten-Zentrifugation 33
9. Radioaktivitätsmessung 33

IV. Resultate

1. Untersuchungen zur Degradierung von linearer Doppelstrang-DNA durch das recBC Enzym 34
1.1 Kofaktoren für die Bindung des Enzyms an die DNA 34
1.2 Bestimmung der mittleren Degradierungs-Geschwindigkeit 38
1.3 Sättigung von DNA mit Enzym 41

2. Degradierung zirkulärer Doppelstrang-DNA mit einzelsträngigen Regionen durch das recBC Enzym 47
2.1 Zeitverlauf und Endprodukte der Degradierung von zirkulärer Doppelstrang-DNA 48
2.2 Degradierung von zirkulärer DNA mit einzelsträngigen Regionen unterschiedlicher Länge 53
2.3 Degradierung von linearer Doppelstrang-DNA mit einzelsträngigen Enden 56

3. Die Reaktion des recBC Enzyms mit zirkulärer Doppelstrang-DNA unter Bedingungen minimaler nukleolytischer Aktivität 63
3.1 Charakterisierung der nukleolytischen Aktivitäten in Gegenwart von Ca^{2+} 64
3.2 Entwindung von zirkulärer DNA in Gegenwart von Ca^{2+} 71

4. Untersuchungen zum Einfluß des recA Proteins auf die nukleolytischen Aktivitäten des recBC Enzyms 77

4.1 Testbedingungen für die Bindung des recA Proteins an einzelsträngige DNA und an zirkuläre Doppelstrang-DNA mit einzelsträngigen Regionen 77

4.2 Effekt des recA Proteins auf die exo- und endonukleolytische Aktivität des recBC Enzyms 84

4.3 Effekt des recA Proteins auf die Degradierung von zirkulärer DNA mit Einzelstrang-Lücken durch das recBC Enzym 91

V. Diskussion

1. Die Reaktion von gereinigtem recBC Enzym mit einzelsträngigen Regionen in doppelsträngiger DNA 95

2. Die Bedeutung des recA Proteins für die Regulation der DNA-Degradierung nach UV-Bestrahlung der Zelle 100

VI. Zusammenfassung 104

VII. Literaturverzeichnis 107

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATP-γ-S	Adenosin 5'-O-(3-thio)triphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
cpm	Impulse pro Minute
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Äthylendiaminotetraacetat
GTP	Guanosintriphosphat
min	Minute
M_r	Molekulargewicht
Polymin P	Äthylenimin-Polymer
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
w/v	Gewicht/Volumen

Konzentrationen von Nukleinsäuren sind in Mol Nukleotiden angegeben.

I. EINLEITUNG

Nukleasen sind Enzyme mit bedeutenden Funktionen im DNA-Stoffwechsel der Bakterienzelle. Bei den Hauptvorgängen des DNA-Stoffwechsels, der Replikation, der Reparatur und der Rekombination von DNA-Molekülen, bewirken Nukleasen die erforderlichen Veränderungen an der DNA. Oft wird eine bestimmte Nuklease so vielfältig verwendet, daß ihre Funktion nicht auf einen der genannten Prozesse beschränkt bleibt. Dies gilt auch für die ATP-abhängigen DNasen, die in zahlreichen bakteriellen Spezies identifiziert wurden und wahrscheinlich zur Enzymausstattung einer jeden Bakterienzelle gehören. Einige dieser DNasen sind sowohl an der genetischen Rekombination als auch an der Reparatur der DNA beteiligt; die genaue Funktion ist jedoch für keines der Enzyme bekannt (s. Clark, 1973; Whitehead et al., 1979). Die bisher *in vitro* untersuchten Enzyme weisen untereinander recht ähnliche Eigenschaften auf (s. Whitehead et al., 1979). Sie bestehen aus mehreren Untereinheiten, besitzen Molekulargewichte um 300 000 und degradieren doppelsträngige DNA von den Enden ausgehend nach einem Mechanismus, bei dem wahrscheinlich ATP-Hydrolyse mit DNA-Entwindung gekoppelt ist. Die ATP-abhängige DNase von *E. coli* wird von den Genen *recB* und *recC* determiniert und wird daher als *recBC* Enzym bezeichnet (Buttin und Wright, 1968; Oishi, 1969; Barbour und Clark, 1970; Tomizawa und Ogawa, 1972). Das Enzym ist hinsichtlich seiner biochemischen Charakterisierung das am besten untersuchte Enzym dieser Gruppe.

Im folgenden Abschnitt werden die wesentlichen gegenwärtigen Kenntnisse über das *recBC* Enzym zusammengefaßt. Weil die Aktivität des *recBC* Enzyms *in vivo* von dem Gen *recA* regu-

liert zu werden scheint, sollen in dem darauffolgenden Abschnitt auch die Eigenschaften des vom Gen recA determinierten Proteins beschrieben werden. Beide Proteine sind für die in dieser Arbeit behandelten Probleme von zentraler Bedeutung.

1. Das recBC Enzym von E. coli

Die Bedeutung des recBC Enzyms für den DNA-Metabolismus von E. coli wird aus dem Erscheinungsbild von recB oder recC Mutanten deutlich. Mutationen in einem der beiden Gene führen zum Verlust der Aktivität des recBC Enzyms. Im Vergleich zum Wildtyp bilden Einfach- oder Doppelmutanten nach Konjugation nur noch ca. 1 % Rekombinanten (daher die Bezeichnung rec- Mutanten) und sind UV-sensibel (s. Clark, 1973). UV-Bestrahlung induziert in der DNA Primärschäden, vorwiegend Pyrimidin-Dimere, die zum größten Teil durch Excisions-Reparatur entfernt werden (s. Hanawalt et al., 1979). Als "Sekundärschäden" entstehen in der neu replizierten DNA gegenüber nicht entfernten Pyrimidin-Dimeren Einzelstrang-Lücken, deren Reparatur auch Rekombinationsprozesse einschließt (Rupp et al., 1971). Die Reparatur der "sekundären, postreplikativen" UV-Schäden ist in recBC Mutanten defekt (Cooper und Hanawalt, 1972; Youngs und Smith, 1976). Das Enzym scheint außerdem für den korrekten Ablauf einiger Prozesse während der normalen Replikation und Zellteilung von Bedeutung zu sein, da recBC Mutanten mit großer Häufigkeit teilungsunfähige Zellen abspalten (Haefner, 1968; Capaldo-Kimball und Barbour, 1971). Die Lebensfähigkeit der recBC Mutanten ist besonders stark beeinträch-

tigt, wenn die Funktion bestimmter Enzyme des DNA-Stoffwechsels durch zusätzliche Mutationen ausfällt. So erwiesen sich Temperatur- sensible Mutationen im Gen für die DNA Polymerase I (polA) und im Gen für die Desoxyadenosin-Methylase (dam) zusätzlich zur recBC Mutation als konditional letal (Monk und Kinross, 1972; Marinus und Morris, 1974). Ein Hinweis auf eine mögliche physikalische Interaktion des recBC Enzyms mit DNA Polymerasen in E. coli wurde gefunden (Hendler et al., 1975).

Das gereinigte recBC Enzym besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, deren Molekulargewichte zu 128 000 und 140 000 bestimmt wurden (Goldmark und Linn, 1972). Das Enzym besitzt mehrere enzymatische Aktivitäten. Es hydrolysiert doppelsträngige DNA exonukleolytisch und mit geringerer Aktivität einzelsträngige DNA exo- und endonukleolytisch. Die DNase Aktivitäten sind strikt an ATP-Hydrolyse gebunden (Goldmark und Linn, 1972). In der Regel ist die ATP-Hydrolyse mit der DNase Aktivität gekoppelt; sie kann jedoch unter besonderen Bedingungen, z.B. mit doppelsträngiger DNA als Substrat, deren Einzelstränge kovalent miteinander verbunden sind, von der DNase Aktivität entkoppelt werden (Karu und Linn, 1972).

Der Vorgang des Abbaues doppelsträngiger DNA ist besonders interessant. Mit doppelsträngiger DNA als Substrat hydrolysiert das recBC Enzym pro Mol gespaltener Phosphodiesterbindungen etwa 20 Mol ATP zu ADP und P_i (Goldmark und Linn, 1972). Die Hydrolyse des ATP dient vermutlich zur Entwindung der DNA. Ein komplexer Degradierungsmechanismus, der DNA-Ent-

windung einschließt, wurde von McKay und Linn (1974) aufgrund der *in vitro* aus doppelsträngiger DNA freigesetzten Produkte formuliert. Das Enzym degradiert danach "prozessiv", d.h. ohne sich vom DNA-Substrat zu lösen, beide Stränge eines DNA-Moleküls, wodurch dieses schrittweise verkürzt wird. Offenbar erfolgt die Degradierung der beiden Stränge aber nicht synchron, da Moleküle mit langen einzelsträngigen Enden als Reaktions-Intermediate isoliert werden konnten. Die Einzelstrangenden dieser Moleküle hatten eine Länge von mehreren hundert bis zu mehreren tausend Nukleotiden und trugen 3'OH und 5'Phosphat Endgruppen mit gleicher Häufigkeit. Als Endprodukte der Reaktion *in vitro* entstehen Oligonukleotide mit einer Kettenlänge von weniger als 10 Nukleotiden und größere einzelsträngige DNA Fragmente von mehreren hundert Nukleotiden Länge (Goldmark und Linn, 1972; McKay und Linn, 1974). Die DNA Fragmente werden in weitaus größeren Mengen gebildet als säurelösliche Produkte, besonders in Gegenwart des Einzelstrang- spezifischen DNA-Bindeproteins von *E. coli* (Sigal et al., 1972; Molineux et al., 1974; Weiner et al., 1975), welches die Einzelstränge vor weiterer Degradierung schützt (McKay und Linn, 1976). Unter diesen Bedingungen wird besonders deutlich, daß die Bildung von Einzelsträngen aus doppelsträngiger DNA durch Entwindung erfolgt und nicht durch einseitigen Abbau. Es wird vermutet, daß die Bildung von Einzelstrang-Enden bei dem Abbau doppelsträngiger DNA sowie die Fähigkeit zur Strang-Entwindung auf die Rolle des Enzyms bei der genetischen Rekombination hinweisen.

Die Aktivität des *recBC* Enzyms ist *in vitro* auf viel-

fältige Weise regulierbar, z.B. beeinflußt die ATP-Konzentration die einzelnen enzymatischen Aktivitäten des recBC Enzyms unterschiedlich (Karu et al., 1973). Zur Stabilisierung seiner aktiven Konformation benötigt das Enzym in vitro K^+-Ionen oder zusätzliches Protein (Hermanns und Wackernagel, 1977). Ein neuer Befund deutet auf eine mögliche Aktivitätsregulierung durch Ca^{2+}-Ionen (Rosamond et al., 1979). Ca^{2+}-Ionen bewirken eine reversible Teil-Inaktivierung der nukleolytischen Aktivitäten des Enzyms, ohne daß die Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse und DNA-Entwindung verloren geht. Die Anwesenheit von Ca^{2+}-Ionen zusätzlich zu geringen Mg^{2+}-Konzentrationen führt daher zu einer modifizierten in vitro- Reaktion des recBC Enzyms mit doppelsträngiger DNA. Die DNA wirkt wie zuvor als Kofaktor zur ATP-Hydrolyse, wird aber nicht zu niedermolekularen Produkten hydrolysiert, sondern bleibt mit Ausnahme weniger Einzelstrangbrüche pro DNA-Molekül intakt (Abb. 1 a). Es wurde von Rosamond et al. (1979) gezeigt, daß die Hydrolyse von ATP offensichtlich mit einer "Bewegung" des Enzyms entlang der DNA gekoppelt ist, wobei vorübergehend, wahrscheinlich nur in der unmittelbaren Umgebung des Enzymmoleküls, einzelsträngige Bereiche auftreten. Diese einzelsträngigen Bereiche in der DNA können durch DNA-Bindeproteine, welche die Renaturierung der DNA verhindern, stabilisiert und elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Abb. 1 b). Das Verhalten des Enzyms mit doppelsträngiger DNA in Gegenwart von Ca^{2+}-Ionen ist von besonderem Interesse, weil damit erstmalig Bedingungen gefunden wurden, unter denen das Enzym keine "unfunktionellen" niedermolekularen DNA-Degradierungs-

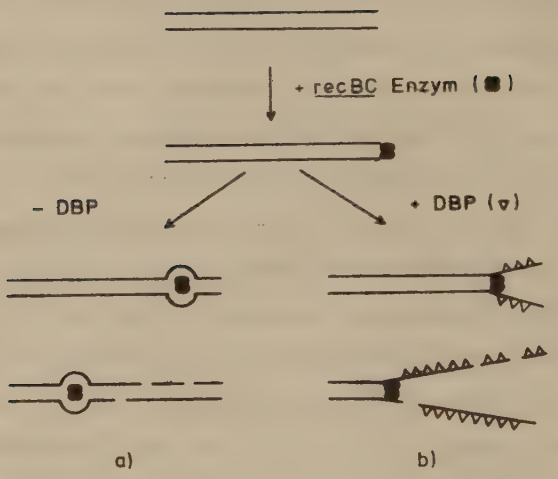

Abb. 1: Modell für den Reaktionsmechanismus des recBC Enzyms mit doppelsträngiger DNA in Gegenwart von Ca^{2+} und Mg^{2+} (nach Rosamond et al., 1979).
Das recBC Enzym allein denaturiert die DNA lokal und hydrolysiert einige Phosphodiesterbindungen; die DNA ist nach beendeter Reaktion doppelsträngig und besitzt das ursprüngliche Molekulargewicht, weist jedoch Einzelstrangbrüche im durchschnittlichen Abstand von 4000 Nukleotiden auf (a). In Gegenwart des DNA-Bindeproteins (DBP) von E. coli wird die DNA zu Einzelstrang-Fragmenten denaturiert (b).

---

produkte bildet, aber seine DNA-Entwindeaktivität voll entfaltet.

Die Wechselwirkung des recBC Enzyms mit der zirkulären chromosomalen DNA in vivo ist noch ungeklärt. Fest steht, daß intakte zirkuläre Doppelstrang-DNA weder nukleolytisch ange-

griffen wird noch als Kofaktor für ATP-Dephosphorylierung dient (Karu et al., 1973). Es kann lediglich spekuliert werden, welche strukturellen Veränderungen an doppelsträngiger zirkulärer DNA auftreten müssen, um die DNA in ein Substrat für das recBC Enzym umzuwandeln. In vitro wird doppelsträngig-zirkuläre DNA, die einzelsträngige Regionen von mindestens fünf Nukleotiden Länge aufweist, vom recBC Enzym degradiert (Karu et al., 1973). Einzelsträngige Regionen sind als intermediäre Strukturen von DNA-Reparatur (s. Grossman et al., 1975; Lehmann und Bridges, 1977), Rekombination (s. Radding, 1973) und Replikation (s. Kornberg, 1974) beschrieben worden. Darüber hinaus wurde beobachtet, daß Einzelstrangbrüche- und Lücken in der DNA die Initiation von Rekombinationsprozessen stimulieren (Benbow et al., 1974; Konrad, 1977), weshalb diesen DNA-Strukturen besondere Aufmerksamkeit zuteil wird. Andererseits gelten einzelsträngige Regionen in der DNA als Ausgangspunkte für die weitgehende Degradierung der chromosomalen DNA, die z.B. nach UV-Bestrahlung der Zellen beobachtet wird. Es wurde gezeigt, daß die Freisetzung von säurelöslichem Material aus der chromosomalen DNA zur Hauptsache auf dem recBC Enzym beruht (Willets und Clark,1969; Moody et al., 1973; Youngs und Bernstein, 1973). Diese DNA-Degradierung scheint von einem zweiten Rekombinations-Gen, dem Gen recA, reguliert zu sein. RecA Mutanten degradieren bereits spontan, d.h. während des normalen Wachstums, ihre DNA mit erhöhter Rate, und nach UV-Bestrahlung mit besonders hoher Rate (Clark et al., 1966; Howard-Flanders und Theriot, 1966). Das Gen recA codiert für ein Protein, dessen Eigenschaften und Funktionen im folgenden Abschnitt beschrieben

werden.

2. Das recA Protein von E. coli

Das Gen recA von E. coli codiert ein Protein, dessen Funktion für Rekombinationsprozesse in vivo und in vitro unerläßlich ist, so daß in recA Mutanten keine genetische Rekombination mehr nachweisbar ist (s. Clark, 1973; Radding, 1978). Eine weitere bedeutende Funktion dieses Proteins ist die Regulation einer Reihe von zellulären Prozessen, die infolge der Schädigung des Chromosoms, bzw. nach Hemmung der DNA-Replikation, koordiniert ablaufen und zum Teil dem Überleben der Zelle oder deren lysogener Bakteriophagen dienen (s. Gudas und Pardee, 1975; Witkin, 1976). Zu diesen vom Gen recA regulierten zellulären Prozessen, die zusammenfassend als "SOS-Funktionen" bezeichnet werden, zählt unter anderem die Erhöhung der Reparaturkapazität für spezielle DNA-Läsionen, die Inhibition der Zellseptenbildung bei blockierter DNA-Synthese und die UV-Induktion des Prophagen lambda. Die erhöhte Reparaturkapazität beruht auf einem induzierbaren Enzymsystem, das offenbar um des Überlebens willen auch fehlerhafte DNA-Reparatur zuläßt (daher "SOS-Funktion"), so daß unter den Überlebenden häufig Mutanten auftreten (s. Lehmann und Bridges, 1977). Auch die Kontrolle der DNA-Degradierung nach UV- oder Röntgenbestrahlung wurde diesen Prozessen zugeordnet. Es wurde vorgeschlagen, daß die relativ niedrige DNA-Degradierungsrate in UV-bestrahlten recA$^+$ Zellen auf der Induktion eines Inhibitors für das recBC Enzym beruht (Marsden et al., 1974; Pollard und Achey, 1975).

Die Expression der oben genannten "SOS-Funktionen"

erfolgt nach gegenwärtigen Vorstellungen in einem komplex regulierten Ablauf. Dieser wird außer vom Gen recA auch noch vom Gen lexA kontrolliert und erfordert die Neusynthese von Protein (deshalb der Begriff "Induktion"; s. Witkin, 1976). Bisher wurde erst ein einziges Protein in $recA^+$ $lexA^+$ Zellen identifiziert, dessen Syntheserate nach Inhibition der DNA Replikation meßbar erhöht ist. Dieses Protein akkumuliert z.B. nach UV-Bestrahlung bis zum 1000-fachen seiner Konzentration in unbestrahlten Zellen (bis zu 3-4 % des gesamten Zellproteins) und war deshalb durch Gelelektrophoresen von radioaktiv markiertem Zellprotein leicht zu identifizieren. Dieses Protein mit einem Molekulargewicht um 40 000 wurde zunächst als "Protein X" bezeichnet (Gudas und Pardee, 1975, 1976; Sedgwick, 1975). Genetische und biochemische Untersuchungen mit verschiedenen recA und lexA Mutanten ließen jedoch erkennen, daß das Protein X mit dem vom recA Gen determinierten Protein identisch ist, und daß das recA Gen unter nicht-induzierenden Bedingungen durch ein Repressorprotein reprimiert wird, welches höchst wahrscheinlich das Produkt des Gens lexA ist. Eine schematische Zusammenstellung der vermuteten Vorgänge während der Induktion von "SOS-Funktionen" ist in Abb. 2 dargestellt. Die Inaktivierung des lexA Repressors erfolgt durch das recA Protein selbst, welches nach Hemmung der DNA Replikation zum "Antirepressor" aktiviert wird und dadurch seine eigene Synthese reguliert (McEntee, 1977; Gudas und Mount, 1977; Little und Kleid, 1977; Emmerson und West, 1977). Welcher Art das Signal ist, mit dem die Inhibition der DNA Replikation angezeigt und das recA Protein zum Antirepressor umgewandelt wird,

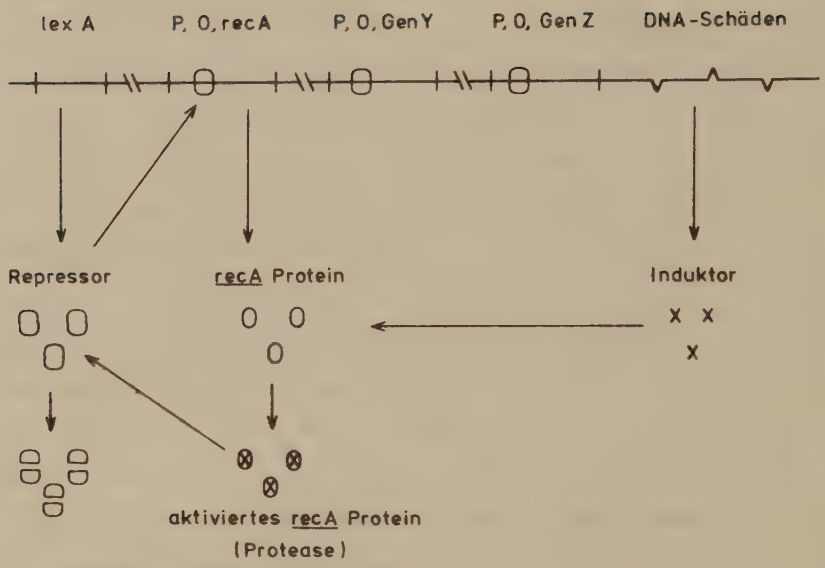

Abb. 2: Modell zur Regulation der "SOS-Funktionen" in E. coli (nach Gudas und Mount, 1977).
In nicht-induzierten Zellen wird die Synthese des recA Proteins und anderer Proteine, deren genaue Anzahl und Funktion nicht bekannt ist (hier angedeutet als Y und Z), durch Bindung des lexA Proteins an die Operatorregion (O) reprimiert. Das recA Protein reagiert wahrscheinlich auf Signale, die durch DNA-Schäden hervorgerufen werden. Man nimmt an, daß bei inhibierter DNA-Synthese niedermolekulare Induktormoleküle akkumulieren, welche an das recA Protein binden. Das so aktivierte recA Protein spaltet den lexA Repressor proteolytisch; dadurch werden anschließend das recA Gen und möglicherweise weitere lexA- regulierte Gene dereprimiert.

ist nicht genau bekannt. Es wurde mehrfach beobachtet, daß für den Verlauf des Induktionsprozesses sowohl die Art der DNA-Schäden als auch die genetische Konstitution der Zelle bezüglich der Gene recB, recC und recF von Bedeutung ist (Gudas und Pardee, 1975, 1976; Oishi und Smith, 1978; McPartland et al., 1980). Nach einer vorläufigen Vorstellung (Gudas und Mount, 1977) erfolgt die Aktivierung des recA Proteins zum "Antirepressor" durch Bindung eines niedermolekularen Bausteins oder Abbauproduktes der DNA. Dieser Effektor wird nach Hemmung der DNA Replikation akkumuliert und wirkt an einem allosterisch regulierbaren Bereich des Proteins. Da das recA Protein an einzelsträngige DNA bindet (Gudas und Pardee, 1975; Shibata et al., 1979; West et al., 1980), könnte es die DNA-Schäden, insbesondere Strang-Lücken, auch direkt erkennen und dadurch aktiviert werden.

Wie schon angedeutet, treten nach Beschädigung der chromosomalen DNA wesentlich höhere intrazelluläre Konzentrationen an recA Protein auf als unter normalen Bedingungen. Es ist bisher ungeklärt, für welche der Funktionen des recA Proteins diese hohen Konzentrationen erforderlich sind. Vorläufig am besten verstanden ist der Vorgang der Induktion des lambda Prophagen als eine recA- kontrollierte Reaktion der Zelle auf UV-Bestrahlung. Es wurde gezeigt, daß diese Prophagen-Induktion auf der proteolytischen Spaltung des lambda cI Repressors (Ptashne et al., 1976) durch das recA Protein selbst beruht (Roberts und Roberts, 1975). Nach Isolation des recA Proteins in hoher Reinheit (Weinstock et al., 1979; Shibata et al., 1979 a; McEntee et al., 1976) und teilweiser Charakterisierung

seiner physikalischen Eigenschaften (Molekulargewicht: 37800 = 352 Aminosäuren; Sancar et al., 1980, Horii et al., 1980; Aggregationszustand-Zustand: Tetramer; McEntee et al., 1976, Ogawa et al., 1978) war es möglich, das Phänomen der Prophagen-Induktion in vitro zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß das recA Protein eine ATP-abhängige Protease ist, welche in Gegenwart von unspezifischen Oligonukleotiden oder einzelsträngiger DNA als Aktivator den cI Repressor des Phagen lambda an einer spezifischen Stelle spaltet (Roberts et al., 1978 a,b). Die Spaltung des lambda Repressors erfordert in vivo jedoch keine wesentlich erhöhten recA Protein Konzentrationen (Baluch et al., 1980). Auch die Inaktivierung des lexA Repressorproteins erfolgt vermutlich durch Proteolyse. Das lexA Protein wird in vitro durch das recA Protein proteolytisch gespalten (Little et al., 1980). Damit bestätigt sich ein Teil des in Abb. 2 wiedergegebenen Modells zur Regulation der "SOS-Funktionen".

Über die recA lexA abhängige Inhibition der Zellteilung, die mutagene DNA-Reparatur und die Regulation der DNA-Degradierung ist sehr wenig bekannt. Möglicherweise wird die Syntheserate weiterer Proteine von den Genen recA und lexA reguliert (Kenyon und Walker, 1980). Es erscheint aber ebenso plausibel, daß das recA Protein selbst an oben genannten Prozessen aktiv beteiligt ist. Von Satta et al. (1979) und früher schon von Gudas und Pardee (1975) wurde vorgeschlagen, daß das recA Protein zur Stabilisierung der DNA beiträgt, indem es an einzelsträngige DNA bindet und diese vor zellulären Nukleasen schützt. Einige Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit

zielen direkt darauf ab, zu klären, ob diese Vorstellung mit den in vitro- Eigenschaften des recA Proteins vereinbar ist.

Folgende Eigenschaften des recA Proteins stehen in Zusammenhang mit seiner Funktion bei der genetischen Rekombination. Das recA Protein hydrolysiert ATP in Gegenwart von einzelsträngiger DNA und stimuliert deren Renaturierung zu Doppelsträngen, falls komplementäre Sequenzen vorliegen (Weinstock et al., 1979). Darüber hinaus katalysiert das recA Protein den Einbau von homologer einzelsträngiger DNA in lineare oder zirkuläre doppelsträngige DNA. Als Produkt entsteht ein sogenannter "Displacement-Loop", eine dreisträngige DNA-Struktur, in der der exogene Einzelstrang mit dem komplementären Strang des doppelsträngigen DNA-Moleküls gepaart ist (Shibata et al., 1979 b; McEntee et al., 1979; Cunningham et al., 1979). In Abb. 3 ist eine solche DNA-Struktur schematisch dargestellt. Die Aufnahme eines Einzelstranges in komplementäre doppelsträngige DNA ist Bestandteil der meisten gegenwärtigen Rekombinations-Modelle (s. Radding, 1978). Die Funktion des recA Proteins bei der Initiation der genetischen

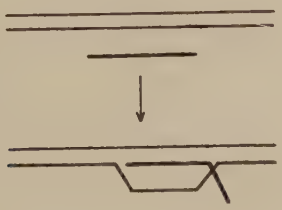

Abb. 3: Schematische Darstellung eines "Displacement-Loops"

Rekombination ist vom Gen lexA unabhängig. Bestimmte lexA Mutanten sind in der Expression der "SOS-Funktionen" blockiert, möglicherweise weil das lexA Repressorprotein nicht mehr spaltbar ist. Sie zeigen folglich keine erhöhte Syntheserate des recA Proteins, sind ebenso wie recA Mutanten sehr UV-sensibel, bilden jedoch Rekombinanten mit normaler Häufigkeit (s. Witkin, 1976).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das recA Protein ein Enzym mit vielfältigen Eigenschaften und Funktionen ist. Es besitzt ATPase-Aktivität, DNA-Binde-Aktivität, proteolytische Aktivität mit bestimmten Repressorproteinen und ist höchst wahrscheinlich allosterisch regulierbar. Auf diesen Eigenschaften beruht seine Funktion bei der genetischen Rekombination, der rekombinativen DNA-Reparatur und seine regulatorische Funktion bei der Induktion der als "SOS-Funktionen" bezeichneten zellulären Prozesse.

II. PROBLEMSTELLUNG

Durch *in vitro*- Untersuchungen wurden bereits zahlreiche Eigenschaften des *recBC* Enzyms detailliert beschrieben. Bei diesen Untersuchungen war aber hauptsächlich lineare doppelsträngige DNA als Substrat eingesetzt worden. Lineare Doppelstrang-DNA tritt in Bakterien, deren Genom als ringförmiges Chromosom vorliegt, normalerweise nicht auf; Strangbrüche, die zu linearen DNA-Strukturen führen, sind für *E. coli* Zellen letal. Dagegen kommen im normalen DNA-Stoffwechsel häufig andere strukturelle Veränderungen der DNA vor, z.B. Einzelstrangbrüche und vor allem einzelsträngige DNA-Bereiche, sogenannte DNA-Lücken. Solche Einzelstrang-Lücken, die im Verlauf von Replikation, Reparatur und Rekombination entstehen, wurden in vorläufigen *in vitro*- Experimenten als Ausgangspunkte für die DNase Aktivität des *recBC* Enzyms identifiziert. Eine Charakterisierung der Reaktion des *recBC* Enzyms an internen und terminalen Lücken in doppelsträngiger DNA, insbesondere an Lücken unterschiedlicher Länge und Polarität, könnte daher zur Aufklärung der vom *recBC* Enzym *in vivo* wahrgenommenen Aufgaben beitragen und war ein Gegenstand dieser Arbeit.

Eine weitere Fragestellung war, auf welche Weise die nach UV-Bestrahlung erfolgende, *recBC*- abhängige DNA-Degradierung von dem *recA* Protein reguliert wird. Frühere Untersuchungen zu diesem Problem ergaben keinen Hinweis darauf, daß in $recA^+$ $lexA^+$ Zellen durch UV-Bestrahlung ein Protein mit einer direkten inhibierenden Wirkung auf die nukleolytischen Aktivitäten des *recBC* Enzyms induziert wird (Prell, 1977). Die Degradierung der beschädigten chromosomalen DNA

könnte andererseits auch durch ein UV-induzierbares Einzelstrang- spezifisches DNA-Bindeprotein reguliert werden. Das recA Protein selbst bindet an Einzelstrang-Lücken in der DNA und wird nach UV-Bestrahlung in großen Mengen synthetisiert. Es wurde daher untersucht, ob das recA Protein in vitro die Funktion übernehmen kann, DNA vor den nukleolytischen Aktivitäten des recBC Enzyms zu schützen. Insbesondere stand auch hier die Frage im Mittelpunkt, ob gerade Einzelstrang-Lücken durch das recA Protein vor einem nukleolytischen Angriff durch das recBC Enzym bewahrt werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Die Nukleosidtriphosphate ATP, GTP, ATP-γ-S (Adenosin 5'-O-(3-thio)triphosphat) und AMP-P-C-P (Adenylyl(β,γ-methylen)-diphosphonat) wurden von Boehringer (Mannheim) bezogen. Dithiothreitol ist ein Produkt von Merck (Darmstadt). ^{3}H-Thymidin und ^{32}P-Phosphorsäure waren von Amersham-Buchler (Braunschweig).

2. Bakterien- und Phagenstämme

E. coli K-12 W3550 su$^-$ prototroph (J.L. Campbell) wurde zur Isolierung des *recBC* Enzyms und der Exonuklease III verwendet. Aus *E. coli* K-12 KM1842 Δ21 (*srl*, *recA*), *spr*51, pLC1842-*recA*$^+$ (K. McEntee) wurde das *recA* Protein isoliert. Dieser Stamm ist ein Derivat von AB1157 und trägt außerdem folgende Marken: *arg*E3, *his*-4, *thr*-1, *leu*-6, *pro*A2, *thi*-1, *str*A31, *lac*Y1, *gal*$^-$, *ara*, *xyl*, *mtl*. Aus *E. coli* K-12 H520 (*end*A, *uvr*A6, *ara*, *xyl*, *mtl*, *gal*, *lac*Y, *thr*, *leu*, *pro*, *his*, *arg*B, *thi*, *tsx*, *str*A, *sup*E) wurde Exonuklease I isoliert (H. Hoffmann-Berling). *E. coli* K-12 W3110 (λ *c*I857 *s*am7) F$^-$, prototroph (E. Cassuto) wurde zur Gewinnung von λ Phagen benutzt. *E. coli* K-12 Hfr GY767, ein prototropher Stamm (R. Devoret), wurde als Wirt für den Bakteriophagen fd verwendet. Der Bakteriophage P22 und der Wirtsbakterienstamm *Salmonella typhimurium* D-25 *thy* stammten von D. Botstein, der Bakteriophage PM2 und sein Wirtsbakterium *Pseudomonas espejiana* (früher *Pseudomonas* BAL-31), von S. Linn.

3. Enzyme

Für die Enzymisolierungen (recBC Enzym, recA Protein, Exonuklease I und III) wurden 80 Liter- Zellkulturen in 1%igem Hefeextrakt-Medium (Ohly, Hamburg), 0,5 % NaCl, pH 7,5 bei 30°C oder 37°C in einem 100 Liter- Chemap Fermenter bis zu einer Zelldichte von 4-6 x 10^8/ml belüftet. Proteinbestimmungen während der Aufarbeitung wurden für weniger gereinigte Fraktionen nach Lowry et al. (1951) durchgeführt, und für die hoch gereinigten Enzymfraktionen nach der empfindlicheren Methode von Heil und Zillig (1970).

3.1 recBC Enzym

Das recBC Enzym wurde wie beschrieben (Hermanns und Wackernagel, 1977) aus E. coli W3550 isoliert. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über den Verlauf einer typischen Aufarbeitung aus 120 g Zellmasse (Naßgewicht). Für die Chromatographie an Hydroxyapatit wurde granuläres Hydroxyapatit verwendet, das mit Silicagel-Partikeln als Kristallisationskeim (10-40 µm Ø, Typ H; Sigma, München) nach der Methode von Mazin et al. (1974) hergestellt wurde. DNA-Zellulose (DNA-Gehalt 1,2 mg/ml) wurde mit gescherter, Hitze- denaturierter Kalbsthymus-DNA (Sigma, München) nach der Methode von Alberts und Herrick (1971) hergestellt. Die Bindung des Enzyms an die DNA-Zellulose verlief am erfolgreichsten bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von ca. 1 ml pro Stunde bei einer Säule von ca. 10 ml Volumen. Die DNA-Zellulose Fraktion wurde bei -20°C in 50 % Glycerin, 20 mM Kalium-Phosphat, pH 8,0, 0,1 mM EDTA und 0,5 mM Dithiothreitol aufbewahrt. Eine Einheit des recBC Enzyms

bildet in 30 Minuten bei 37°C 1 nMol säurelösliche Produkte aus doppelsträngiger P22 DNA.

Tabelle 1: Reinigung des recBC Enzyms

Fraktion	Enzymeinheiten Gesamt	Protein (mg) Gesamt	Spezifische Aktivität
Zellextrakt	400 000	5000	80
Ammonium Sulfat	384 000	4400	87
DEAE-Zellulose	150 000	295	508
Hydroxyapatit	91 000	33	2760
DNA-Zellulose	18 000	≤ 0,2	≥ 90000

3.2 recA Protein

Das recA Protein wurde aus E. coli KM1842 isoliert. Der Stamm trägt eine Deletion (recA Δ 21) im Chromosom und enthält ein Plasmid hoher Kopiezahl (pLC1842), welches ein recA$^+$ Gen integriert hat (Weinstock et al., 1979). Durch die Mutation spr51 im Gen lexA wird das recA Protein konstitutiv synthetisiert und liegt in hohen intrazellulären Konzentrationen vor. Zusätzlich wurde die DNA-Replikation 90 Minuten vor der Ernte der Zellkultur durch Nalidixinsäure (Sigma, München; 40 µg/ml) gehemmt. Die Reinigung des recA Proteins erfolgte nach der Methode von Weinstock et al. (1979), welche durch einen Gelfiltrations-Schritt mit Biogel-Agarose Typ A-0,5 m (Biorad, Richmond/Calif.) ergänzt wurde, um eine geringe Verunreinigung mit einer Einzelstrang- spezifischen Exonuklease zu entfernen. Als enzymatischer Aktivitätstest diente

die ATPase Aktivität des recA Proteins in Gegenwart von einzelsträngiger DNA. Eine ATPase-Einheit hydrolysiert 1 nMol ATP in 30 Minuten bei 37°C. Aus 40 Litern Zellkultur (ca. 75 g Zell-Naßgewicht) wurden 2 mg recA Protein isoliert. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über den Verlauf einer Aufarbeitung. Das Protein wurde bei -20°C in 50 % Glycerin, 50 mM Tris-HCl, pH, 7,5, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA und 1 mM Dithiothreitol aufbewahrt.

Flachgel-Polyacrylamid-Elektrophoresen (10 %iges Gel mit 0,1 % SDS), die durchgeführt wurden wie von Laemmli (1970) beschrieben, ergaben eine Reinheit des recA Proteins von mindestens 95 % und ein Molekulargewicht von 38000 für das monomere recA Protein.

Tabelle 2: Reinigung des recA Proteins

Fraktion	Enzymeinheiten Gesamt	Protein (mg) Gesamt	Spezifische Aktivität
Zellextrakt	$1,5 \times 10^7$	5600	2670
Polymin P	$8,8 \times 10^6$	2540	3460
Ammonium Sulfat	3×10^6	650	4600
Phosphozellulose	$1,1 \times 10^5$	10,5	10470
Agarose-Gel	$2,4 \times 10^4$	2	12000

3.3 Exonuklease III

Exonuklease III wurde wie von Richardson und Kornberg (1964) beschrieben aus E. coli W3550 isoliert. Die Phosphozellulose Fraktion besaß eine spezifische Aktivität von mehr als 10 000 Einheiten/mg Protein und enthielt keine kontaminierende Einzel-

strang- spezifische Endo- und Exonukleaseaktivität. Eine Enzymeinheit degradiert in 30 Minuten bei 37°C 1 nMol doppelsträngige DNA zu säurelöslichen Produkten.

3.4 Exonuklease I

Exonuklease I wurde aus *E. coli* K-12 H520 nach der Methode von Lehman und Nussbaum (1964) isoliert. Die Phosphozellulose Fraktion hatte eine spezifische Aktivität von 6000 Einheiten/mg Protein. Eine Einheit degradiert 1 nMol einzelsträngige DNA in 30 Minuten bei 37°C. Das Enzympräparat enthielt keine kontaminierende Einzelstrang-spezifische Endonuklease-Aktivität. Das Enzym wurde verwendet, um die Spaltung von einzelsträngiger zirkulärer DNA durch Endonukleasen zu verfolgen. Es diente dabei dem Abbau von linearen Einzelstrang-Fragmenten.

3.5 S1-Nuklease

S1-Nuklease aus *Aspergillus oryzae* wurde aus α-Amylase (Sigma, München) nach der Methode von Vogt (1973) gereinigt. Das Enzym besaß eine spezifische Aktivität von 1×10^6 Einheiten/mg Protein. Eine Einheit degradiert in 30 Minuten bei 37°C 1 nMol einzelsträngige DNA zu säurelöslichen Produkten.

3.6 λ Exonuklease

Die Exonuklease des Bakteriophagen λ wurde im Verlauf einer Staatsexamensarbeit wie von Radding (1971) beschrieben aus *E. coli* K-12 W3350 (λ T11) isoliert. Die Phosphozellulose Fraktion (α β Fraktion) besaß eine spezifische Aktivität von 25 000 Einheiten/mg Protein. Eine Einheit degradiert in 30

Minuten bei 37°C 10 nMol doppelsträngige DNA zu säurelöslichen Produkten.

3.7 T4 Polynukleotid-Ligase

Die DNA Ligase des Bakteriophagen T4 wurde mir von Herrn Dr. W. Wackernagel zur Verfügung gestellt. Das Enzym wurde aus dem E. coli Stamm 1100 (λ NM983)3 nach Thermoinduktion des Lysis -defekten λ Phagen, welcher das T4 DNA Ligase Gen trägt, isoliert.

4. Isolierung und radioaktive Markierung von Bakteriophagen DNA

4.1 P22 DNA

Die DNA des Bakteriophagen P22 von Salmonella typhimurium ist ein lineares doppelsträngiges Molekül mit einem Molekulargewicht von 28 x 10^6 (Susskind und Botstein, 1978). P22 DNA wurde in einem Glucose-Casamino acids Medium (Ray und Schekman, 1969) nach der Methode von Carter und Radding (1971) mit ^{3}H-Thymidin (2,5 mCi/Liter) markiert und isoliert. Die spezifische Radioaktivität der DNA aus verschiedenen Aufarbeitungen lag zwischen 2,4 und 8 x 10^6 cpm/µMol Nukleotide.

4.2 PM2 DNA

Die DNA des Bakteriophagen PM2 des marinen Bakteriums Pseudomonas espejiana ist ein zirkuläres doppelsträngiges Molekül mit superhelikalen Windungen (Espejo et al., 1969). PM2 DNA wurde in einem Medium nach Franklin et al. (1969), welches zusätzlich 0,2 % Glucose und 0,5 % vitamin-freie Casamino acids (Difco) enthielt, mit ^{3}H-Thymidin (2,5 mCi/Liter) markiert.

Die Anreicherung der Phagen erfolgte nach der Methode von Hinnen et al. (1974), die DNA wurde wie von Espejo et al. (1969) beschrieben isoliert. Aus einem Liter Rohlysat wurde meist ca. 1 mg gereinigte DNA gewonnen, deren spezifische Radioaktivität zwischen 2,5 und 10 x 10^6 cpm/µMol Nukleotide lag.

4.3 T7 DNA

^{32}P-markierte DNA des Bakteriophagen T7 von E. coli wurde mir freundlicherweise von Frau Dr. B. Dreiseikelmann zur Verfügung gestellt. Die radioaktive Markierung und Isolierung der DNA erfolgte wie beschrieben (Bøvre und Szybalski, 1971). T7 DNA ist ein lineares doppelsträngiges Molekül mit einem Molekulargewicht von 26,5 x 10^6 (McDonell et al., 1977) und wurde in einigen Experimenten als Marker-DNA für Saccharosegradienten-Zentrifugationen verwendet.

4.4 λ DNA

Die DNA des Bakteriophagen λ von E. coli ist doppelsträngig-linear und besitzt komplementäre 5'Einzelstrang-Enden von 12 Nukleotiden Länge (Wu und Tailor, 1971). Das Molekulargewicht beträgt 31 x 10^6 (Davidson und Szybalski, 1971). λ DNA wurde aus E. coli W3110 (λ cI857 sam7) durch thermische Induktion des Prophagen gewonnen, die radioaktive Markierung mit ^{32}P-Phosphat (3 mCi/Liter) erfolgte in LCG-20 Medium (Carter und Radding, 1971). Die spezifische Radioaktivität der durch Phenol-Extraktion gewonnenen DNA lag meist um 2 x 10^8 cpm/µMol Nukleotide.

4.5 fd DNA

Die DNA des Bakteriophagen fd von E. coli ist ein einzelsträngiges zirkuläres Molekül mit einem Molekulargewicht von $1,9 \times 10^6$ (Berkowitz und Day, 1976). Die Phagen wurden in dem E. coli K-12 GY767 Hfr thy^+ Stamm in Komplettmedium (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt (Difco), 1 mM K-Phosphat, 1 mM $CaCl_2$, 2,5 mM $MgCl_2$) vermehrt und mit ^{3}H-Thymidin (3 mCi/Liter) in Anwesenheit von 250 µg/ml Desoxyadenosin (Merck, Darmstadt) radioaktiv markiert. Die Phagen wurden mit 4 % Polyäthylenglycol (Serva, Heidelberg) aus dem Kulturüberstand ausgefällt, die weitere Isolierung der DNA erfolgte nach der von Goldmark und Linn (1970) beschriebenen Methode. Die spezifische Radioaktivität der DNA betrug $8,5 \times 10^6$ cpm/µMol Nukleotide bei einer Ausbeute von 3,5 mg aus einem Liter Kultur.

5. Präparation von DNA-Substraten für das recBC Enzym und das recA Protein

5.1 PM2 DNA mit Einzelstrang-Lücken

PM2 [^{3}H]DNA mit einer begrenzten Anzahl von 3'OH - 5'Phosphat Einzelstrangbrüchen wurde mit pankreatischer DNase I (Melgar und Goldthwait, 1968) präpariert. DNase I aus Rinderpankreas mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Einheiten/mg Protein wurde von Miles Laboratories (Elkhardt/Indiana) bezogen.

Bei einer DNA Konzentration von 0,5 µMol Nukleotide/ml wurden pro ml Reaktionsgemisch (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithiothreitol) 30 ng DNase I eingesetzt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe

von 20 µMol EDTA/ml und 1/10 Volumen Phenol beendet. Die DNA wurde gegen 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 1 mM EDTA dialysiert. Die mittlere Anzahl der Einzelstrangbrüche pro DNA-Molekül wurde durch Sedimentation der DNA in alkalischen Saccharosegradienten ermittelt (Burgi und Hershey, 1963). Als Molekulargewichtsmarker diente ^{32}P-markierte λ DNA. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Substrate enthielten durchschnittlich 1, 2 oder 2,7 Strangbrüche pro DNA-Molekül.

Die Präparation der Einzelstrang-Lücken erfolgte mit Exonuklease III von E. coli, welche an Einzelstrang-Brüchen und-Lücken vom 3'OH Ende Nukleotide abspaltet (Masamune et al., 1971). Die mittlere Größe der Einzelstrang-Lücken wurde aus der Menge der freigesetzten radioaktiven Nukleotide berechnet, wobei angenommen wurde, daß Strangbrüche und -Lücken für das Enzym gleich gute Substrate bilden. Die geeignete Enzymkonzentration zur Herstellung von einzelsträngigen Regionen von 13 bis zu 650 Nukleotiden Länge wurde in Vorversuchen mit kleinen Reaktionsansätzen ermittelt. Das Reaktionsgemisch enthielt 70 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,7 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol und pro ml etwa 0,4 µMol DNA. Die DNA-Präparate wurden 10 Minuten bei 37°C mit 0,25 bis 12 Einheiten Exonuklease III pro µMol DNA inkubiert. Die Reaktion wurde wie oben beschrieben beendet, und die DNA gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1 mM EDTA dialysiert.

5.2 P22 DNA mit einzelsträngigen Enden

^{3}H-markierte P22 DNA-Substrate mit einzelsträngigen 5'Phosphat Enden verschiedener Länge wurden mit Exonuklease III wie oben beschrieben präpariert. P22 DNA mit einzelsträngigen

3'OH Enden wurde mit λ Exonuklease hergestellt. λ Exonuklease degradiert in einem prozessiven Reaktionsmechanismus von doppelsträngiger DNA den 5'Strang (Carter und Radding, 1971). Die Enden der P22[^{3}H]DNA wurden mit Enzymmolekülen gesättigt (Dreiseikelmann und Wackernagel, 1978),und das Ausmaß der Degradierung wurde durch die Wahl der Inkubationstemperatur und-zeit kontrolliert (5-15^{o}C; 2-15 Minuten). Die mittlere Länge der Einzelstrang-Enden wurde aus den freigesetzten säurelöslichen radioaktiven Nukleotiden berechnet.

Das Reaktionsgemisch enthielt 67 mM Glycin-KOH, pH 9,6, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA und 1 mM Dithiothreitol. Nach beendeter Reaktion wurde das Enzym durch Phenol inaktiviert und die DNA gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1 mM EDTA dialysiert.

5.3 Einzelsträngige lineare DNA

Zur Denaturierung von doppelsträngiger DNA wurde diese 5 Minuten auf 100^{o}C erhitzt, anschließend in Eis abgekühlt. Zuvor wurde die Lösung auf 50 mM K-Phosphat pH 7,5 eingestellt, wodurch ein Absinken des pH-Wertes während des Erhitzens vermieden wurde. ^{3}H-markierte P22 DNA wurde nach der Denaturierung direkt als Substrat für Einzelstrang- spezifische Exonukleasen (Exonuklease I, recBC Enzym) und als Substrat für das recA Protein (Renaturierungs-Experiment, s. Absch. 7.7) verwendet ehe signifikante Renaturierung eintrat. Kalbsthymus-DNA (Sigma, München) wurde vor der Denaturierung geschert (Absch. 5.4), um das Molekulargewicht und die hohe Viskosität zu reduzieren. Einzelsträngige Kalbsthymus-DNA wurde als Kofaktor zur Messung der ATPase Aktivität des recA Proteins

verwendet.

Für ein Experiment wurde lineare, nicht-komplementäre Einzelstrang-DNA benötigt (s. Absch. IV 4.2). Sie wurde aus zirkulärer fd[^{3}H]DNA mit pankreatischer DNase I hergestellt. Das Reaktionsgemisch enthielt pro ml 10 µMol $MgCl_2$, 20 µMol Tris-HCl, pH 7,5, 1 µMol Dithiothreitol, 60 nMol fd DNA und 65 pg DNase I und wurde 20 Minuten bei 14°C inkubiert. Die DNA wurde phenolisiert und gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1 mM EDTA dialysiert. Das mittlere Molekulargewicht der DNA-Fragmente ($6,6 \times 10^5$) wurde durch Sedimentation in einem alkalischen Saccharosegradienten mit λ[^{32}P]DNA als Marker ermittelt.

5.4 Fragmentierung von doppelsträngiger DNA durch Scherung

Native P22 DNA (0,5 µMol/ml) und Kalbsthymus-DNA (2 mg/ml) wurden durch hydrodynamische Scherkräfte fragmentiert. Die DNA-Lösungen wurden 10 mal durch eine Kanüle Nr. 30 gesogen. Das Molekulargewicht der P22 DNA wurde durch Sedimentation in einem neutralen Saccharosegradienten ermittelt.

6. Bestimmung der säurelöslichen Nukleotide

Die aus radioaktiv markierter DNA durch verschiedene DNasen freigesetzten säurelöslichen Nukleotide wurden gemessen wie beschrieben (Wackernagel und Hermanns , 1974). Die Reaktionsgemische wurden mit 0,5 ml 7%iger Perchlorsäure und 0,2 ml BSA Lösung (25 mg/ml) gemischt, das Volumen wurde auf 1 ml eingestellt. Nach 5 Minuten bei 0°C wurde die nicht-säurelösliche DNA durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge (5 Minuten , 8000 g) präzipitiert. Die Menge der säurelöslichen

Nukleotide wurde aus der Radioaktivität im Überstand berechnet.

7. Enzymteste

7.1 Messung der DNase Aktivität des recBC Enzyms

Das Standard-Reaktionsgemisch zur Messung der DNase Aktivität des recBC Enzyms mit verschiedenen DNA-Substraten enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM Dithiothreitol, 80 mM KCl, 10 % Glycerin und pro ml 0,5 mg elektrophoretisch reines Rinderserum-Albumin (Behringwerke, Marburg). Die optimale ATP-Konzentration lag mit allen DNA-Substraten zwischen 0,3 und 3 mM, gemessen wurde mit 0,5 mM oder 1 mM ATP. Für einige Experimente enthielt das Reaktionsgemisch nur 1 mM $MgCl_2$ und zusätzlich 1 mM bzw. 10 mM $CaCl_2$. Bei diesen Experimenten war die ATP-Konzentration 5 mM. Die eingesetzte DNA-Menge, die Enzymkonzentration und das Reaktionsvolumen wird für jedes Experiment gesondert angegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA beendet, falls das Reaktionsgemisch auf Saccharosegradienten aufgegeben wurde. Zur Messung der säurelöslichen Degradierungsprodukte wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 7 %iger Perchlorsäure gestoppt.

Eine Einheit des recBC Enzyms bildet bei 37°C und pH 7,5 in 30 Minuten 1 nMol säurelösliche Produkte aus doppelsträngiger P22 DNA, wenn pro 0,3 ml Reaktionsgemisch 10 nMol DNA eingesetzt werden (Goldmark und Linn, 1972). Unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen degradiert eine Einheit recBC Enzym 0,05 nMol denaturierte P22 DNA, und 0,1 nMol zirkuläre fd DNA wird endo- und exonukleolytisch degradiert. In Abwesenheit von ATP war keine nukleolytische Aktivität meßbar.

7.2 Filterbindungstest

Die Bindung des recBC Enzyms an native ^{3}H-markierte P22 DNA wurde über die Adsorption der Protein-DNA Komplexe an Nitrozellulose-Membranfilter (Typ SM11306, Porendurchmesser 0,45 µm; Sartorius, Göttingen) gemessen. Das Enzym wurde mit der DNA und den zu testenden Kofaktoren in 0,15 ml Standard-Reaktionsgemisch (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 80 mM KCl, 0,5 mM Dithiothreitol und 60 µg/ml Rinderserum-Albumin) 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Proben von 50 µl wurden auf je einen Filter aufgetragen.

Der Filterbindungstest wurde nach Riggs et al. (1970) und Wilcox und Smith (1976) modifiziert. Die Nitrozellulose-Filter wurden 20 Minuten in Standard-Reaktionsgemisch eingeweicht und auf Edelstahlnetzen mit Glasfiber-Filtern (Typ GF/C; Whatman, Springfield Mill, England) als Unterlage mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe fest angesaugt. Die 50 µl-Proben wurden ohne angelegten Unterdruck gefiltert. Es wurde unter leichtem Unterdruck mit 100 - 150 µl Standard-Reaktionsgemisch nachgewaschen. Die Filter wurden unter einer Rotlicht-Lampe getrocknet. Die auf den Filtern befindliche Radioaktivität wurde wie beschrieben (Absch. 9) gezählt.

7.3 ATPase Test

γ-^{32}P-ATP wurde nach der Methode von Glynn und Chappel (1964) präpariert, die von Bergmann (1975) für kleine Aufarbeitungen modifiziert wurde. Das ^{32}P-markierte ATP wurde mit unmarkiertem ATP auf eine spezifische Radioaktivität von 2-5 x 10^{5} cpm/µMol eingestellt. Der Test beruht auf der Messung des radio-

aktiv markierten freien Phosphats, welches nicht an Aktivkohle aus Holz (Norit A; Serva, Heidelberg) adsorbiert. Die Durchführung wurde von Goldmark und Linn (1972) beschrieben.

7.4 Testbedingungen für S1-Nuklease

Die Degradierung von einzelsträngiger DNA durch die S1-Nuklease von Aspergillus oryzae erfolgte in Reaktionsgemischen mit 30 mM Na-Acetat pH 4,5 , 10 mM NaCl und 0,3 mM $ZnSO_4$ mit großem Enzym-Überschuß bei 37°C (Sutton, 1971).

7.5 Ligase-Behandlung von P22 DNA mit Einzelstrangbrüchen

P22 DNA wurde nach der Inkubation mit dem recBC Enzym (in Gegenwart von Ca^{2+}) gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1 mM EDTA dialysiert. 4 nMol der DNA wurden mit T4 DNA-Ligase in 0,1 ml Reaktionsgemisch (66 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA , 0,5 mM Dithiothreitol und 0,2 mM ATP) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der verbliebenen Einzelstrangbrüche wurde durch Zentrifugation in einem alkalischen Saccharosegradienten ermittelt.

7.6 Endonuklease-Test

Der Endonuklease-Test mißt die Überführung von zirkulärer einzelsträngiger fd DNA in die lineare, Exonuklease I -sensible Form (Goldmark und Linn, 1970). ^3H-markierte fd DNA wurde mit der jeweiligen Endonuklease (s. unten) in Reaktionsvolumen von 50 - 100 µl bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden mit Exonuklease I- Reaktionsgemisch (67 mM Glycin-KOH pH 9,6 , 6 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol) auf 0,5 ml aufgefüllt und mit einem Überschuß an Exonuklease I gegen-

über der eingesetzten DNA Menge nochmals 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Exonuklease I hydrolysiert einzelsträngige DNA vom 3'OH Ende zu Mononukleotiden (Lehman und Nussbaum, 1964). Aus der säurelöslichen DNA Menge wurde der Anteil linearisierter fd DNA-Moleküle berechnet. Eine Endonuklease Einheit linearisiert in 30 Minuten bei 37°C 1 nMol fd DNA. Der Test diente zur Messung der endonukleolytischen Aktivität des recBC Enzyms und zur Identifizierung von eventuell vorhandenen Einzelstrang- spezifischen Endonukleasen in den gereinigten Enzympräparaten, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

7.7 Messung der enzymatischen Aktivitäten des recA Proteins

Das Standard-Reaktionsgemisch für das recA Protein enthielt 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 , 20 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithiothreitol, und pro ml 0,5 mg Rinderserum-Albumin.

Zur Bestimmung der ATPase Aktivität wurde das recA Protein in 0,1 ml Standard-Reaktionsgemisch mit 100 nMol γ-^{32}P-ATP (ca. 20 000 cpm) und 15 nMol Hitze- denaturierter Kalbsthymus-DNA 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Weinstock et al., 1979). Ein Mol des gereinigten recA Proteins hydrolysierte unter diesen Testbedingungen 16 Mol ATP/min.

Die vom recA Protein katalysierte Renaturierung von denaturierter P22 DNA wurde gemessen wie von Weinstock et al. (1979) beschrieben. Das recA Protein wurde mit 7,5 nMol denaturierter P22[^{3}H]DNA und 1 mM ATP in 50 µl Standard-Reaktionsgemisch bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml S1-Nuklease Reaktionsgemisch (Absch. 7.4), 400 Einheiten S1-Nuklease und 10 µg Hitze- denaturierter Kalbsthymus-DNA gestoppt.Es wurden weitere 30 Minuten bei 37°C

inkubiert. Der Anteil der S1-Nuklease- resistenten, doppelsträngigen DNA wurde aus der Menge der Säure- präzipitierbaren ^{3}H-markierten DNA berechnet. Unter den Versuchsbedingungen erfolgte die Renaturierung der P22 DNA (nach Subtraktion der spontanen Renaturierung) mit einer Rate von 1 nMol DNA/µg recA Protein/30 min.

Sowohl die ATPase Aktivität als auch die DNA-Renaturierungsaktivität des gereinigten recA Proteins entsprachen den bereits publizierten Werten (Weinstock et al., 1979; Shibata et al., 1979 a; West et al., 1980).

7.8 Bedingungen zur Bildung von Komplexen aus recA Protein und DNA und anschließender Degradierung der DNA durch das recBC Enzym

Diese Experimente wurden in dem oben beschriebenen Standard-Reaktionsgemisch (Absch. 7.7) durchgeführt, das sowohl für das recA Protein als auch für das recBC Enzym optimale Reaktionsbedingungen bereitstellt. Zur Bindung des recA Proteins an verschiedene DNA-Substrate wurde 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Falls nicht anders vermerkt, enthielten die Reaktionsansätze 1 mM GTP. Zur Analyse der recA Protein-DNA Komplexe wurden 0,1 ml- Proben ohne Zusatz von EDTA auf neutrale Saccharosegradienten aufgetragen (Absch. 8). Nach Zugabe des recBC Enzyms zu den Reaktionsansätzen wurde nochmals 5 - 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch EDTA und Kühlung in Eis gestoopt. Säurelösliche Degradierungsprodukte wurden ermittelt wie beschrieben (Absch. 6). Für die Analysen der Degradierungsprodukte durch Zentrifugation in neutralen Saccharosegradienten wurden die Reaktions-

ansätze mit SDS (Endkonzentration 0,1 % w/v) versetzt.

8. Saccharosegradienten-Zentrifugation

Vorgeformte 5-20 %ige Saccharosegradienten wurden mit Proben-Volumen von etwa 0,1 - 0,15 ml beladen. Neutrale Saccharose-lösungen enthielten 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1 M NaCl. Alkalische Lösungen enthielten 1 mM EDTA, 0,7 M NaCl und 0,3 M NaOH. Für Sedimentations-Analysen von Komplexen des recA Proteins mit einzelsträngiger DNA enthielten die Saccharoselösungen 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 , 20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol und Rinderserum-Albumin (0,1 mg/ml). Die Zentrifugation erfolgte meist in einem Beckman SW60 TI Rotor mit 50 000 Upm bei 4°C. Die Laufzeit ist für jedes Experiment gesondert angegeben. Von jedem Gradienten wurden 30 - 40 Fraktionen gesammelt.

9. Radioaktivitätsmessung

Das Volumen der zu messenden wässrigen Lösungen wurde mit H_2O auf 0,5 ml aufgefüllt und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt, die pro Liter 640 ml Toluol, 360 ml Triton X-100 (Serva, Heidelberg), 3,2 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO; Packard, Zürich) und 64 mg 2,2'-p-Phenylen-bis-(4-methyl-5-phenyloxazol) (POPOP; Merck, Darmstadt) enthielt. Nitrozellulose-Filter wurden auf den Boden des Zählröhrchens gelegt und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (1 Liter Toluol mit 5 g PPO und 0,1 g POPOP) übergossen. Die Radioaktivität wurde in einem Szintillations-Spektrometer (Packard, Modell 2425) bestimmt.

IV. RESULTATE

1. Untersuchungen zur Degradierung von linearer Doppelstrang-DNA durch das recBC Enzym

Für Untersuchungen über den Abbau bestimmter DNA-Substrate, z.B. wie in Absch. 2 beschrieben, wäre es wünschenswert gewesen, Reaktionsintermediate in genügend großen Mengen für eine Charakterisierung zu erhalten. Dazu ist aber ein möglichst synchroner Ablauf der Degradierung unter Bedingungen notwendig, unter denen Substrat mit Enzym abgesättigt ist. Deshalb wurde zunächst versucht, den DNA-Abbau durch Vorbildung von DNA-Enzym-Komplexen zu synchronisieren. Obwohl sich bei diesen Versuchen herausstellte, daß solche Bedingungen für zirkuläre DNA-Substrate wohl nicht existieren, sollen Ergebnisse, die mit linearer doppelsträngiger DNA gewonnen wurden, doch angeführt werden, weil sie mehrere Eigenschaften des recBC Enzyms erstmalig beschreiben.

Mit linearer Doppelstrang-DNA als Substrat ist eine Bildung von DNA-Enzym-Komplexen ohne gleichzeitige DNA-Degradierung möglich. Die Versuche, die zu diesem Befund führten, sind in Absch. 1.1 beschrieben. Aufgrund dieser Eigenschaft des Enzyms war es möglich, die mittlere Degradierungsgeschwindigkeit mit doppelsträngiger DNA auf direkte Weise zu ermitteln (Absch. 1.2). Absch. 1.3 beschreibt Versuche zur Ermittlung der DNA-sättigenden Enzymkonzentration.

1.1 Kofaktoren für die Bindung des Enzyms an die DNA

Die Bedingungen für die Bindung des Enzyms an P22 DNA (lineare doppelsträngige DNA vom Molekulargewicht 28×10^6) wurden durch Adsorption des Komplexes aus Enzym und ^{3}H-markierter

DNA an Nitrozellulose-Membranfilter bestimmt. Proteinfreie native DNA wird an Filter dieses Typs (Porengröße 0,45 µm) nicht gebunden; Proteine und DNA-Protein-Komplexe binden dagegen an Nitrozellulose. Diese Methode wurde bereits mehrfach verwendet, um die Bindung analoger ATP-abhängiger DNasen an die Enden doppelsträngiger DNA nachzuweisen (Linder und Sastry, 1971; Wilcox und Smith, 1976).

Das recBC Enzym benötigt als Kofaktoren zur DNA-Degradierung Mg^{2+} und ein hydrolysierbares Nukleosidtriphosphat (ATP, GTP). Es wurde nun geprüft, ob die Bindung von Enzym an die DNA auch ohne Kofaktoren oder mit nur einem Kofaktor möglich ist, also in Abwesenheit von DNA-Degradierung. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die getesteten Kofaktoren, die allein keine DNA-Degradierung ermöglichten. Bei Anwesenheit von zweiwertigen Kationen (Mg^{2+}, Ca^{2+}) als einzigen Kofaktoren wurde das Enzym nur in sehr geringem Maße zur Bindung an die DNA aktiviert. Ein signifikanter Anstieg der Anzahl von DNA-Protein-Komplexen war meßbar, wenn Enzym und DNA mit ATP (in Abwesenheit von Mg^{2+}) vorinkubiert wurden. Die optimale Inkubationszeit bei 37°C war 2 Minuten. ATP ließ sich nicht durch das Analogon Adenylyl(β,γ-methylen)-diphosphonat (AMP-PCP) ersetzen, welches vom recBC Enzym nicht hydrolysiert und wahrscheinlich auch nicht gebunden wird (Wright et al., 1971). Auch GTP, welches als Kofaktor bei der DNA-Degradierung mit gleicher Wirksamkeit vom recBC Enzym hydrolysiert wird wie ATP (Wright et al., 1971), stimulierte die Bindung des Enzyms an das DNA-Substrat deutlich weniger als ATP (Tab. 3). Möglicherweise wirkt GTP nur als Mg^{2+}-GTP-Komplex als Kofaktor für das

Kofaktoren:		DNA am Filter gebunden
Kationen	Nukleosidtriphosphate	(%)
——	——	2,3
Mg^{2+}	——	3,0
Ca^{2+}	——	6,4
Ca^{2+},Mg^{2+}	——	5,4
——	ATP	20,5
——	AMP-PCP	2,3
Mg^{2+}	AMP-PCP	2,6
——	GTP	6,2

Tab. 3: Kofaktoren zur Bindung des recBC Enzyms an P22 DNA

5,5 Einheiten recBC Enzym wurden zu 0,15 ml des Standard-Reaktionsgemisches (Absch. III 7.2) gegeben, das 3 nMol P22 [^{3}H]DNA und die angegebenen Kofaktoren enthielt. Die Konzentration der Nukleosidtriphosphate betrug 0,5 mM. Kationen wurden in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Mg^{2+}: 10 mM; Ca^{2+}: 3 mM, bzw. 3 mM Ca^{2+} plus 1 mM Mg^{2+}. Die Reaktionsansätze wurden 2 min bei 37°C inkubiert. Je 3 Nitrozellulose-Filter wurden mit 50 µl des Reaktionsansatzes beladen und mit 0,1 ml des Reaktionsgemisches mit den entsprechenden Kofaktoren nachgewaschen.
Die Bestimmung der auf den Filtern befindlichen Radioaktivität erfolgte wie in Absch. III.9 beschrieben. Die Tabelle gibt die Mittelwerte aus den 3 Messungen an. Von den Werten wurde der Anteil der DNA subtrahiert, welcher unspezifisch in Abwesenheit von Enzym an die Filter bindet (2,4 %).

Enzym.

Es wurde schon früher gefunden, daß das recBC Enzym in vitro zur Stabilisierung seiner Fähigkeit, an DNA zu binden, K^+-Ionen oder Rinderserum-Albumin benötigt; in Abwesenheit dieser Faktoren ist das Enzym nach kurzer Inkubationszeit (ca. 1 Minute) nicht mehr aktiv (Hermanns und Wackernagel, 1977). Es kann durch nachträgliche Zugabe von KCl reaktiviert werden. Diese Eigenschaft des Enzyms wurde mit oben beschriebenen Filterbindungstesten überprüft und bestätigt. Ohne KCl und Rinderserum-Albumin im Reaktionsansatz wurde unter sonst gleichen Testbedingungen (s. Legende zur Tab. 3) nur 1,7 % der DNA an die Filter gebunden, statt 20,5 % in Gegenwart von aktivem recBC Enzym und ATP; nach Reaktivierung des Enzyms durch Zugabe von KCl wurden wieder 17,5 % der DNA gebunden. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, daß die gemessene, ATP-abhängige Assoziation von Protein mit der DNA im wesentlichen auf der Gegenwart von funktionsfähigem recBC Enzym beruhte und nicht durch Fremdproteine in dem Enzympräparat verursacht wurde.

Der Anteil der DNA, die nach Inkubation mit dem recBC Enzym und ATP an Nitrozellulose adsorbierte, war zur eingesetzten Enzymmenge proportional (Abb. 4). Es zeigte sich, daß zur Bindung von 1 nMol P22 DNA an die Filter ca. 10 Einheiten recBC Enzym notwendig sind. Auf diesen Befund wird in Absch.1.3 noch näher eingegangen.

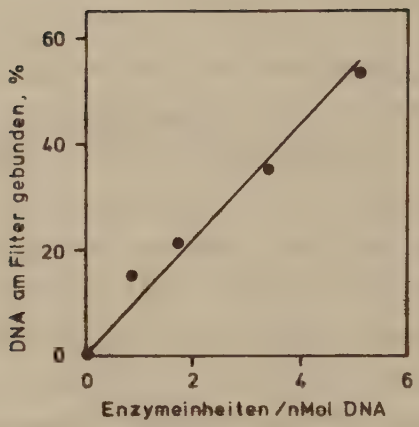

Abb. 4: Adsorption von P22 DNA an Nitrozellulose-Membranfilter in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. 3 nMol P22 [^{3}H]DNA wurden mit den angegebenen Enzymmengen 2 Minuten bei 37°C in Gegenwart von 0,5 mM ATP inkubiert. Weitere Versuchsbedingungen und Subtraktion des Blindwertes sind der Legende von Tab. 3 zu entnehmen.

1.2 Bestimmung der mittleren Degradierungs-Geschwindigkeit

Das recBC Enzym degradiert doppelsträngig-lineare DNA prozessiv, d.h. ein Enzymmolekül bleibt bis zur vollständigen Degradierung eines Substrat-Moleküls mit diesem verbunden (McKay und Linn, 1974). Die mittlere Geschwindigkeit der Degradierung eines P22 DNA-Moleküls wurde wie folgt ermittelt. Das Enzym wurde in Gegenwart von ATP an die DNA gebunden. Durch Zugabe von Mg^{2+} wurde die Degradierung der (^{3}H-markierten) DNA eingeleitet und konnte dann durch Messung der gebildeten säurelöslichen Degradierungsprodukte verfolgt werden. Gleichzeitig mit dem Start der Reaktion durch Zugabe von Mg^{2+} wurde unmarkierte doppelsträngige Kalbsthymus-DNA in so hohem

Überschuß als Substrat-Kompetitor zugesetzt, daß eine nachträgliche Initiation der Degradierung weiterer P22 DNA-Moleküle praktisch nicht mehr stattfinden konnte (s. Kontrollreaktion in Abb. 5). Unter diesen Bedingungen wird die Produktion von ^{3}H-markiertem, säurelöslichem Material eingestellt, sobald ein Enzymmolekül nach beendeter Degradierung eines P22 DNA Moleküls frei wird.

Abb. 5 zeigt den zeitlichen Verlauf der Degradierung von P22 [^{3}H]DNA zu säurelöslichen Produkten in Anwesenheit und Abwesenheit von kompetitiver Kalbsthymus-DNA. Zur Bindung des Enzyms an die P22 DNA wurde in Gegenwart von ATP bei 37°C 2 Minuten vorinkubiert. Nach Zugabe von Mg^{2+} erfolgte in Abwesenheit von Kalbsthymus-DNA während der ersten 3 Minuten eine lineare Zunahme der säurelöslichen Produkte (24 % nach 3 min.). Einem identischen Reaktionsgemisch wurden gleichzeitig mit Mg^{2+} Kalbsthymus-DNA in 150-facher Konzentration gegenüber der P22 DNA zugesetzt. In diesem Fall war die Produktion von ^{3}H-markiertem säurelöslichem Material (3,5 %) nach ca. 45 Sekunden beendet. Dieser Wert zeigt die Zeit an, in der ein komplettes P22 DNA-Molekül (M_r = 28 x 10^6; 4,3 x 10^4 Nukleotidpaare) bei 37°C vom recBC Enzym degradiert wird. Die Degradierung von P22 DNA, deren Molekulargewicht durch hydrodynamische Scherung auf 8,8 x 10^6 herabgesetzt worden war (Absch. III 5.4), wurde bereits nach ca. 15 Sekunden beendet (Abb. 5 A). Daraus läßt sich abschätzen, daß die mittlere Geschwindigkeit, mit der sich das recBC Enzym unter Degradierung entlang doppelsträngiger DNA bei 37°C fortbewegt, bei ca. 950 Nukleotidpaaren pro Sekunde liegt. Bei niedrigerer Temperatur (10°C) ist diese

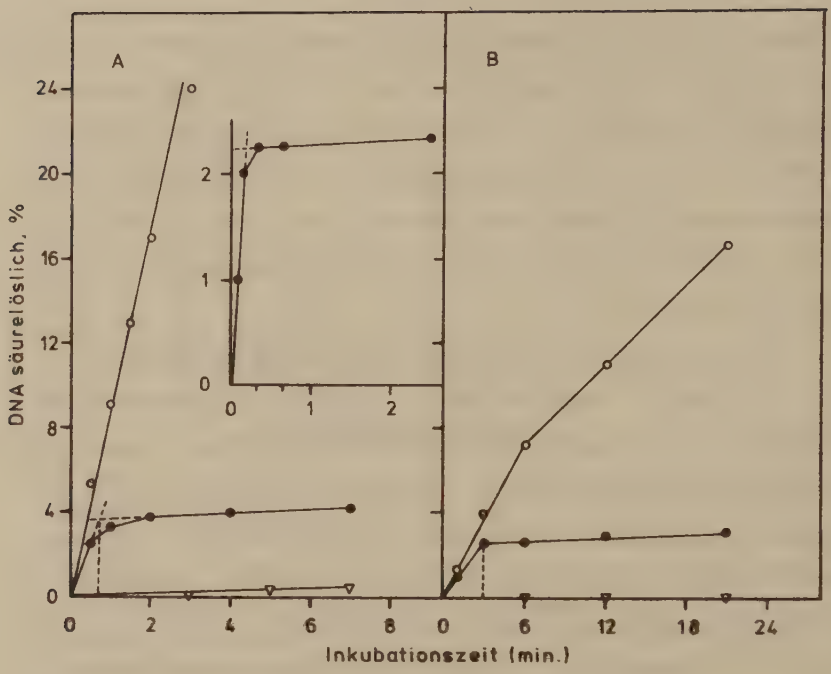

Abb. 5: Degradierung von P22 DNA durch das recBC Enzym bei 37°C (A) und bei 10°C (B).

(●) in Gegenwart der 150-fachen Konzentration an unmarkierter Kalbsthymus-DNA (eingeschobene Abb. - P22 DNA-Fragmente mit einem Molekulargewicht von $8{,}8 \times 10^6$)

(o) in Abwesenheit von Kalbsthymus-DNA

(▽) Kontrollreaktion: das Enzym wurde direkt dem Gemisch aus P22 DNA und Kalbsthymus-DNA zugesetzt

22 Einheiten recBC Enzym wurden mit 12 nMol P22 [^{3}H]DNA in 0,3 ml Standard-Reaktionsgemisch (Absch. III 7.1) mit 0,5 mM ATP 2 min bei 37°C bzw. 15 min bei 10°C vorinkubiert. Die Degradierung der DNA wurde durch Zugabe von 1,5 ml Reaktionsgemisch gestartet, das 12 mM $MgCl_2$ und 0,5 mM ATP (bzw. zusätzlich 1,8 µMol gescherte Kalbsthymus-DNA) enthielt. Aus den Reaktionsansätzen wurden nach den angegebenen Zeiten je 0,3 ml zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte entnommen.

Geschwindigkeit auf ein Viertel reduziert (ca. 240 Nukleotidpaare/Sekunde; Abb. 5 B).

1.3 Sättigung von DNA mit Enzym

Das recBC Enzym benötigt zur vollständigen Degradierung eines P22 DNA-Moleküls bei 37°C etwas weniger als 1 Minute. Aus der minimalen Enzymmenge, die in einer Minute eine Population von P22 DNA-Molekülen degradiert, läßt sich die zur Sättigung der DNA notwendige Enzymmenge berechnen. Die Degradierungsprodukte, die vom recBC Enzym aus linearer doppelsträngiger DNA gebildet werden, bestehen zu einem Drittel aus säurelöslichen Oligonukleotiden und zu zwei Dritteln aus nicht-säurelöslichen DNA-Fragmenten, die durch Sedimentation in Saccharosegradienten identifiziert werden können. Dieses Verhältnis von säurelöslichen Produkten und DNA-Fragmenten wurde beobachtet, wenn ein Überschuß an P22 DNA für längere Zeit mit Enzym inkubiert wurde (z.B. 30 Minuten) und zeigte sich ebenfalls nach einer 1-minütigen Inkubation mit einer hohen Enzymkonzentration. Abb. 6 zeigt ein Beispiel. Die P22 [^{3}H]DNA wurde mit 10 Einheiten recBC Enzym/nMol DNA für 1 Minute bei 37°C inkubiert. Nach Entnahme einer Probe für die Bestimmung der säurelöslichen Produkte wurde der Rest zur Analyse der nicht-säurelöslichen Reaktionsprodukte in einem neutralen Saccharosegradienten zentrifugiert. Es zeigte sich, daß bei dem verwendeten Enzym-Substrat-Verhältnis 67 % der DNA-Moleküle degradiert wurden (Fraktion 18-32). Da 23 % säurelösliche Produkte gemessen wurden, bestanden 44 % der DNA aus säureunlöslichen Fragmenten. Das bedeutet, daß die Menge säurelöslicher Produkte ein Drittel

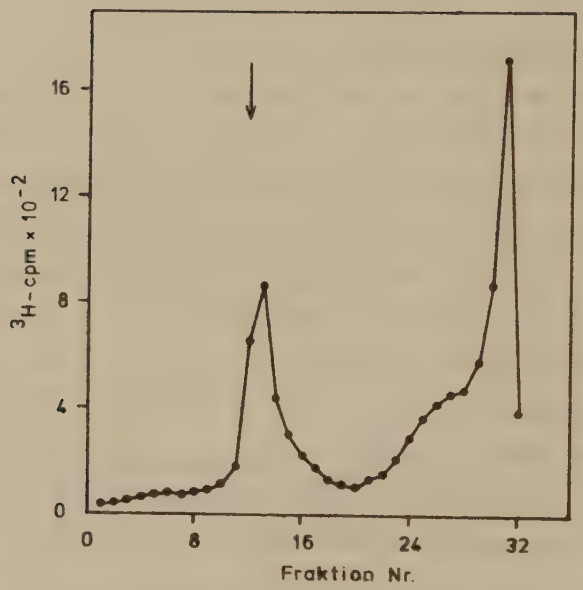

Abb. 6: Sedimentation der Degradierungsprodukte aus P22 DNA in einem neutralen Saccharosegradienten. 2 nMol P22 [^{3}H]DNA wurden in 0,1 ml Reaktionsgemisch mit 20 Einheiten recBC Enzym und 1 mM ATP (ohne Mg^{2+}) 2 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $MgCl_2$ (Endkonzentration 10 mM) gestartet. Nach 1 min wurde EDTA im Überschuß zugesetzt und 1/4 des Reaktionsansatzes zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte (23 %) entnommen. Der Rest des Reaktionsansatzes wurde in einem neutralen Saccharosegradienten 3 Stunden bei 50 000 Upm im SW60 TI Rotor zentrifugiert. Der Pfeil markiert die Position von λ[^{32}P]DNA im gleichen Gradienten.

aller degradierten Moleküle anzeigt. Zur Bestimmung der sättigenden Enzymmenge für eine bestimmte DNA-Menge wurde ein konstanter DNA-Betrag bei verschiedenen Enzymkonzentrationen inkubiert (Abb. 7). Bei der Berechnung der sättigenden Enzymkonzentration konnte nun aufgrund des oben beschriebenen Experimentes angenommen werden, daß bei 33 % säurelöslichen Produkten die gesamte DNA degradiert ist. Eine Extrapolierung der Geraden auf 33 % ergibt einen Wert von ca. 15 Einheiten recBC Enzym/nMol P22 DNA (Abb. 7). Die in Absch. 1.1 beschriebenen Filterbindungs-Experimente ergaben einen vergleichbaren Wert: zur Bindung von 1 nMol DNA an die Filter waren ca. 10 Einheiten recBC Enzym erforderlich.

In diesem Zusammenhang ergibt sich folgender scheinbarer Widerspruch. Während eine Enzymeinheit definiert ist als die Menge Enzym, die in 30 Minuten bei 37°C 1 nMol DNA in säurelösliche Produkte überführt, wurde nun gefunden, daß zur Absättigung von 1 nMol P22 DNA nicht weniger als 10-15 Einheiten recBC Enzym erforderlich sind. Dieser Widerspruch erweist sich tatsächlich als scheinbar, wenn man berücksichtigt, daß die Degradierung eines P22 DNA-Moleküls in weniger als 60 Sekunden abgeschlossen ist.

Aus den Substrat-Sättigungsversuchen (Abb. 7) und einer groben Berechnung, wieviele Mole Enzym einer Enzymeinheit entsprechen, ergibt sich eine andere, tatsächliche Diskrepanz. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes des recBC Enzyms (270 000) und der spezifischen Aktivität des Enzympräparates, das etwa 50 % rein ist (Hermanns und Weckernagel, 1977), läßt sich abschätzen, daß etwa 1×10^{10} Enzymmoleküle eine

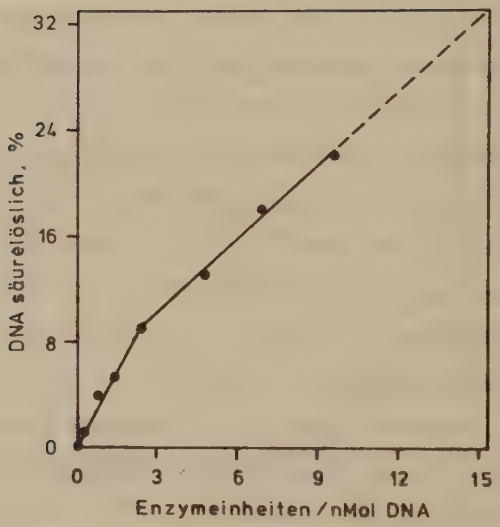

Abb. 7: Sättigung von P22 DNA mit recBC Enzym.

10 nMol P22 [^{3}H]DNA wurden mit den angegebenen Enzymmengen und 0,5 mM ATP in 0,25 ml Reaktionsansätzen 2 min bei 37^{o}C vorinkubiert. Nach Zugabe von 10 mM $MgCl_2$ wurden aus den Reaktionsansätzen je vier 50 µl Proben in Abständen von 15, 30 oder 60 Sekunden (entsprechend der eingesetzten Enzymmenge) zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte entnommen. Die Freisetzung des säurelöslichen Materials verlief linear mit der Zeit. Aufgetragen ist der nach 1 min gemessene Wert.

Enzymeinheit darstellen. Dagegen besteht 1 nMol P22 DNA aus nur 7 x 10^9 DNA-Molekülen. Da für die Sättigung von 1 nMol P22 DNA 10-15 Einheiten Enzym erforderlich sind, ergibt sich daraus, daß pro DNA-Molekül nicht weniger als 15-20 Enzymmoleküle eingesetzt werden müssen, um an jedes DNA-Molekül mindestens ein Enzymmolekül zu binden. Ein ähnlich hoher Wert von 10 Enzymmolekülen pro DNA-Molekül wurde auch für eine andere, prozessive Rekombinations-Nuklease, die Exonuklease des Phagen lambda, in mehreren unabhängigen Bestimmungen gefunden (Little, 1967; Radding und Carter, 1971; Dreiseikelmann und Wackernagel, 1978). Eine mögliche Ursache für diese Beobachtungen könnte sein, daß in einem Enzympräparat von hoher Reinheit ein großer Teil der Moleküle enzymatisch inaktiv, jedoch unverändert im chromatographischen Verhalten ist. Hinzu kommt, daß möglicherweise bei Beginn der DNA-Degradierung (trotz der Vorbildung von DNA-Enzym-Komplexen) nicht alle aktiven Enzymmoleküle an doppelsträngige DNA gebunden sind. Nachträglich könnten diese freien Enzymmoleküle dann an solche Einzelstränge binden, die vom recBC Enzym während der Degradierung von doppelsträngiger DNA als Produkte gebildet werden. Dann tragen diese Enzymmoleküle aber nicht mehr zur Degradierung doppelsträngiger DNA bei. Diese Interpretation erklärt auch den abknickenden Kurvenverlauf in Abb. 7.

Aus den Befunden ergibt sich folgende Schlußfolgerung für die weiteren Experimente. Zur Sättigung von 1 nMol der im folgenden häufig verwendeten PM2 DNA (1 nMol besteht aus 3,5 x 10^{10} Molekülen) wären demnach mindestens 70 Enzymein-

heiten notwendig, falls das Enzym an diese DNA mit derselben Effektivität bindet wie an lineare doppelsträngige DNA. Tatsächlich dürfte die Bindung wegen der zirkulären Struktur dieser DNA aber noch wesentlich schwächer sein. Deshalb wären Enzymmengen notwendig gewesen, die auch bei Aufarbeitung aus 120 g-Portionen (Ausbeute aus einem 80 Liter -Fermenterlauf) nicht zur Verfügung gestanden hätten. In den späteren Versuchen mit PM2 DNA konnten darum sättigende Enzymkonzentrationen nicht eingesetzt werden, um z.B. Reaktionsintermediate für eine strukturelle Analyse zu gewinnen.

2. Degradierung zirkulärer Doppelstrang-DNA mit einzelsträngigen Regionen durch das recBC Enzym

Aus Arbeiten von Goldmark und Linn (1972) und Karu et al. (1973) ist bekannt, daß intakte zirkuläre DNA und zirkuläre DNA mit Einzelstrangbrüchen *in vitro* kein Substrat für das recBC Enzym darstellt. Dagegen wird doppelsträngig-zirkuläre DNA mit einzelsträngigen Regionen von mindestens fünf Nukleotiden Länge vom recBC Enzym zu nicht sedimentierbaren Produkten degradiert (Karu et al., 1973). Da das Enzym einzelsträngige DNA sowohl endonukleolytisch spaltet als auch exonukleolytisch degradiert (Goldmark und Linn, 1972), ist zu vermuten, daß die Degradierung der zirkulären DNA durch einen endonukleolytischen Schnitt im Einzelstrangbereich eingeleitet und exonukleolytisch fortgesetzt wird. In diesem Fall würden die Degradierungs-Endprodukte die gleichen sein wie bei der Degradierung von linearer Doppelstrang-DNA. Aufgrund der Fähigkeit des Enzyms, DNA zu entwinden, könnte auch ein Mechanismus zutreffen, nach dem die zirkuläre DNA nicht unmittelbar endonukleolytisch gespalten, sondern zunächst von der Einzelstrang-Lücke ausgehend entwunden wird. Bei dieser Reaktion würden hauptsächlich größere einzelsträngige Fragmente und möglicherweise nur wenig säurelösliche Produkte gebildet. Als Reaktionsintermediate könnten zirkuläre Moleküle mit vergrößerten einzelsträngigen Regionen auftreten. Dieser Mechanismus würde voraussetzen, daß das Enzym die spezifische Struktur der einzelsträngigen Region, nämlich den Übergang zum doppelsträngigen Bereich, erkennt.

Mit den in den folgenden Abschnitten (2.1 - 2.3 und 3) beschriebenen Versuchen wurde der Vorgang des Abbaues von

zirkulärer DNA mit Einzelstrang-Lücken durch das recBC Enzym näher charakterisiert.

2.1 Zeitverlauf und Endprodukte der Degradierung von zirkulärer Doppelstrang-DNA

^{3}H-Thymidin-markierte zirkuläre Doppelstrang-DNA mit dem Molekulargewicht 6 x 10^{6} wurde aus dem Bakteriophagen PM2 isoliert (s. Absch. III 4.2). In diese DNA wurden Einzelstrang-Lücken definierter Anzahl und Länge (mit 3'OH und 5'Phosphat Endgruppen) durch aufeinanderfolgende Behandlung mit pankreatischer DNase I und Exonuklease III aus E. coli eingeführt (s. Absch. III 5.1).

Es wurden zunächst DNA-Moleküle präpariert, die durchschnittlich 2,7 einzelsträngige Regionen enthielten, die nur wenig größer waren als die kleinste vom recBC Enzym noch angreifbare Lücke von 5 Nukleotiden Länge (ca. 13 Nukleotide/Lücke). Dieses DNA Präparat wurde selbst bei Einsatz von relativ hohen Enzym-Konzentrationen während der 30-minütigen Reaktionen mit konstant niedriger Rate zu säurelöslichen Produkten degradiert (s. Abb. 8A). Dieselbe DNA wurde nach einer kurzen Ultraschall-Behandlung, die die zirkulären Moleküle in lineare Fragmente mit einem Molekulargewicht von ca. 10^{6} zerlegte, mit mehr als 10-fach höherer Rate degradiert (Abb. 8A). Ähnliche Ergebnisse wurden mit einem PM2 DNA-Substrat erzielt, welches größere einzelsträngige Regionen von etwa 40 Nukleotiden Länge enthielt. Diese DNA wurde ebenfalls mit niedriger Rate degradiert, die um mehr als das 10-fache anstieg, wenn die DNA zuvor mit der Einzelstrang- spezifischen Endonuklease S1 aus Aspergillus oryzae inkubiert wurde (Abb. 8B). Durch die

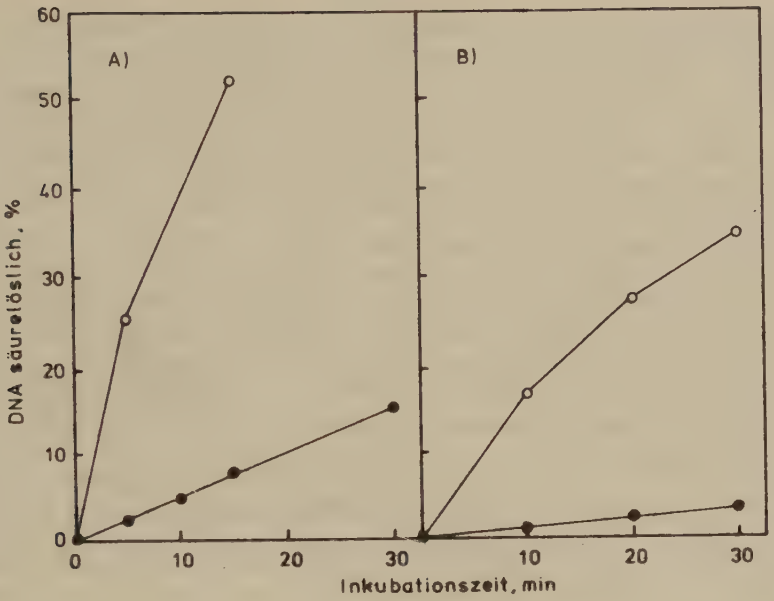

Abb. 8: Niedrige Degradierungsrate von zirkulärer PM2 DNA

A) 10,2 nMol PM2 [^{3}H]DNA (● ; pro Molekül ca. 2,7 Einzelstrang-Lücken von 13 Nukleotiden Länge) wurden mit 18 Einheiten recBC Enzym in 6-fachen Reaktionsansätzen bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden 0,3 ml Proben zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte entnommen. (o); Identische Reaktionsgemische wurden kurz vor der Zugabe des Enzyms mit der Mikrospitze eines Branson B-12 Ultraschallgerätes beschallt (12 s auf Stufe 2).

B) 9,2 nMol PM2 [^{3}H]DNA wurden in 200 µl S1-Nuklease Reaktionspuffer (Absch. III 7.4) mit 2,5 Einheiten S1-Nuklease (o) bzw. in Abwesenheit von S1-Nuklease (●) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die DNA-Lösungen mit EDTA versetzt, 5 Minuten auf 65°C erhitzt und mit dem Standard-Reaktionsgemisch für das recBC Enzym auf 1,5 ml aufgefüllt. Nach Zugabe des recBC Enzyms (10,5 Einheiten) wurden nach den angegebenen Zeiten 0,3 ml Proben für die Messung der säurelöslichen Produkte entnommen.

Endonuklease-Behandlung wurden die zirkulären DNA-Moleküle, welche durchschnittlich zwei einzelsträngige Regionen enthielten, in lineare Fragmente mit doppelsträngigen Enden zerlegt. Aus diesen Befunden ist zu schließen, daß die Degradierung von zirkulärer doppelsträngiger DNA mit Lücken durch das recBC Enzym zu säurelöslichem Material offenbar im Vergleich zur Degradierung von linearer DNA ein langsamer Prozeß ist. Dies mag darauf beruhen, daß im Verlauf der Reaktion die Substrat-Moleküle nur mit niedriger Rate zu leicht abbaubaren linearen Fragmenten umgewandelt werden. Zur Unterstützung dieser Annahme kann angeführt werden, daß die endonukleolytische Aktivität des recBC Enzyms auch mit einzelsträngiger DNA als Substrat relativ niedrig ist (Goldmark und Linn, 1972; s. Absch. III 7.1 und IV 4.2).

Als alternative Erklärung wurde in Betracht gezogen (s.o.), daß das Enzym möglicherweise die zirkuläre DNA von den einzelsträngigen Regionen ausgehend bevorzugt entwindet und einen höheren Anteil nicht-säurelöslicher DNA-Fragmente freisetzt als bei der Degradierung von linearer Doppelstrang-DNA. In diesem Fall würde durch die Messung der säurelöslichen Produkte der tatsächliche Anteil degradierter DNA unterschätzt. Die Degradierungsprodukte aus linearer Doppelstrang-DNA bestehen etwa zu einem Drittel aus säurelöslichen Produkten und zu zwei Dritteln aus nicht-säurelöslichen Fragmenten. Dieses Verhältnis wurde durch Sedimentation der Degradierungsprodukte in neutralen Saccharosegradienten ermittelt (s. Absch. IV 1.3, Abb. 6).

Mit folgendem Experiment wurden die Degradierungs-End-

produkte charakterisiert, die vom recBC Enzym aus Lücken enthaltender zirkulärer PM2 DNA gebildet werden. Es wurden 4 nMol PM2 [^{3}H]DNA (das Substrat von Abb. 8A) mit 9 Einheiten recBC Enzym 30 Minuten inkubiert. Der Anteil der säurelöslichen Degradierungsprodukte wurde in einem Teil des Reaktionsansatzes bestimmt und betrug 20 %. Die verbliebene DNA wurde zusammen mit ^{14}C-markierter Plasmid DNA (ColE1) in einem neutralen Saccharosegradienten zentrifugiert. Das Ergebnis zeigt Abb. 9. Der Hauptanteil der DNA (70 %) sedimentierte mit unverändertem S-Wert von 20,5 und bestand daher aus zirkulären DNA-Molekülen (lineare PM2 DNA würde in neutralen Gradienten um ca. 15 % langsamer sedimentieren, sodaß der Peak um etwa 2-3 Fraktionen zum Meniskus verschoben wäre). Es wurde nun geprüft, ob unter den zirkulären DNA-Molekülen auch solche waren, in denen vom recBC Enzym durch Entwindung vergrößerte Lücken gebildet worden waren. Dazu wurden zwei Drittel jeder Peakfraktion mit einem Überschuß der Einzelstrang- spezifischen Endonuklease S1 inkubiert, wodurch einzelsträngige DNA zu säurelöslichen Produkten umgesetzt wird. Es zeigte sich, daß in der Hauptfraktion des Peaks ca. 0,34 % der Gesamt-DNA einzelsträngig vorlag; dieser Wert stimmte mit der ursprünglichen Größe der Einzelstrang-Lücken überein (ca. 0,2 %). Der größte Teil der DNA bestand also aus intakter Substrat-DNA. Es wurden insgesamt nur 30 % der DNA-Moleküle degradiert, zwei Drittel der Degradierungsprodukte stellten säurelösliches Material dar.

Demnach wurde durch die Messung der säurelöslichen Produkte (Abb. 8) der tatsächliche Anteil degradierter DNA nicht unterschätzt. Ein Hinweis auf eine deutlich erhöhte Entwinde-

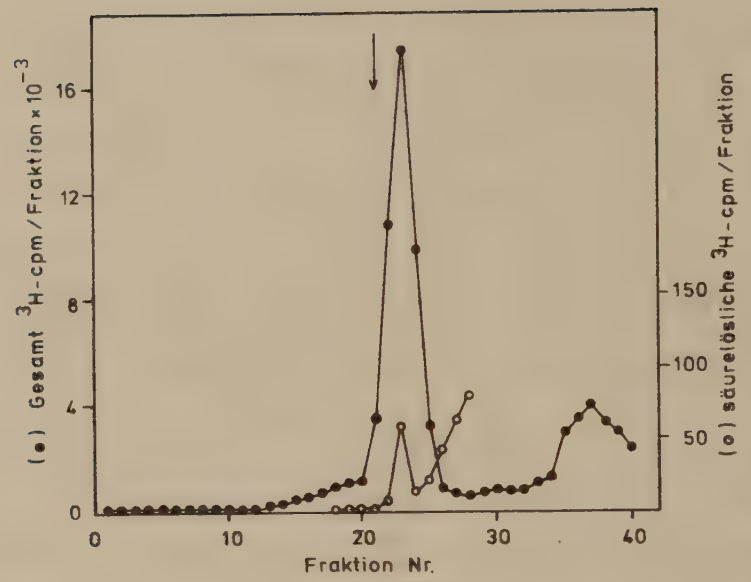

Abb. 9: Sedimentation der Degradierungsprodukte aus zirkulärer PM2 DNA in neutralen Saccharosegradienten. 4 nMol PM2[^{3}H]DNA (das gleiche Substrat wie in Abb. 8 A) wurden mit 9 Einheiten recBC Enzym in 0,2 ml Standard-Reaktionsgemisch (0,5 mM ATP) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde EDTA im Überschuß zugesetzt und 1/5 des Reaktionsansatzes zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte entnommen. Der Rest des Reaktionsansatzes wurde in einem neutralen Saccharosegradienten 3 Stunden bei 50 000 Upm im SW56 Rotor zentrifugiert. 40 Fraktionen wurden gesammelt. Ein Drittel jeder Fraktion wurde zur Bestimmung der Radioaktivität verwendet (●). Der verbliebene Anteil der Fraktionen wurde mit je 0,5 ml S1-Reaktionsgemisch und 6 Einheiten S1 Nuklease versetzt. Nach 30 Minuten bei 37°C wurde das säurelösliche Material bestimmt (○). Der Pfeil markiert die Position der ColE1 ^{14}C DNA (23 S) im gleichen Gradienten.

aktivität des recBC Enzyms mit zirkulärer DNA ergab sich aus diesem Experiment nicht. Das Ergebnis ließ sich mit der Annahme vereinbaren, daß die getestete zirkuläre DNA mit niedriger Rate linearisiert und nachfolgend mit wesentlich höherer Rate exonukleolytisch zu säurelöslichen und säureunlöslichen Produkten degradiert wurde. Lineare Zwischenprodukte waren aus diesem Grunde nicht nachweisbar. Obwohl keine zirkulären Zwischenprodukte mit vergrößerten einzelsträngigen Regionen nachgewiesen wurden, war nicht auszuschließen, daß das recBC Enzym eine Aktivität zur Erweiterung von Einzelstrang-Lücken besitzt. Es wäre durchaus denkbar, daß das Enzym bei Erkennung des Überganges vom einzelsträngigen zum doppelsträngigen Bereich die zunächst noch zirkuläre DNA partiell entwindet und währenddessen den freigelegten Einzelstrang endonukleolytisch spaltet. Ebenso wie bei einer direkten Spaltung im Einzelstrangbereich würden Zwischenprodukte vermutlich sehr rasch degradiert und wären unter den gegebenen Testbedingungen nicht meßbar.

2.2 Degradierung von zirkulärer DNA mit einzelsträngigen Regionen unterschiedlicher Länge

Die in Abschnitt 2.1 beschriebenen Versuche zeigten, daß zirkuläre DNA mit einzelsträngigen Regionen von einer Länge bis zu 40 Nukleotiden vom recBC Enzym mit relativ niedriger Rate degradiert wird. Diese DNA-Substrate besaßen allerdings auch nur sehr kleine "Erkennungsstellen" für die Endonuklease Aktivität des Enzyms: 0,4 % bzw. 1 % der Gesamtlänge dieser Moleküle war einzelsträngig. Es wurde daher überprüft, ob das Enzym

zirkuläre DNA mit wesentlich größeren Einzelstrang-Lücken häufiger linearisiert und mit höherer Rate zu niedermolekularen Produkten degradiert.

Zirkuläre DNA-Substrate mit einzelsträngigen Regionen von sehr unterschiedlicher Länge wurden wie beschrieben (Absch. III 5.1) aus PM2 [^{3}H] DNA präpariert. Die DNA enthielt durchschnittlich zwei Einzelstrang-Lücken pro Molekül. Bezogen auf die Gesamtlänge der PM2 DNA (ca. 8600 Nukleotidpaare) betrug der einzelsträngige DNA-Anteil in den einzelnen Präparaten etwa 1 %, 3,2 % bzw. 16 % (entsprechend 40, 130 bzw. 650 Nukleotide /Lücke). Diese DNA-Substrate wurden vom recBC Enzym mit gleich niedriger Rate zu säurelöslichen Produkten degradiert. Auch eine Charakterisierung der Degradierungsprodukte durch Sedimentation in neutralen Saccharosegradienten ergab keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Degradierung dieser DNA-Substrate. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die Verteilung der einzelnen Degradierungsprodukte war für alle drei DNA-Substrate identisch. Das Verhältnis von säurelöslichen Produkten (11 %) zu nicht-säurelöslichen Fragmenten (ca. 20 %) entsprach etwa dem, welches auch bei der Degradierung von linearer Doppelstrang-DNA gefunden wurde. Der Haupt-Anteil der DNA (70 %) bestand nach wie vor aus intakten Substrat-Molekülen, die in der Position von zirkulärer DNA sedimentierten. In keinem der Gradienten waren signifikante Mengen linearer PM2 DNA-Moleküle von vollständiger Länge feststellbar.

Die endonukleolytische Aktivität des recBC Enzyms wurde also trotz Erhöhung des einzelsträngigen DNA-Anteils auf das

Reaktionsprodukte	Länge der einzelsträngigen Regionen (Nukleotide)		
	40	130	650
	% der gesamten DNA		
Säurelösliche Produkte	11,3	11,2	11,9
Säureunlösliche Fragmente	18	20	20
Unangegriffene DNA	71	69	68

Tabelle 4 : Die Degradierung von zirkulärer PM2 DNA mit einzelsträngigen Regionen verschiedener Länge. 3,2 nMol PM2[^{3}H]DNA, welche pro Molekül zwei einzelsträngige Regionen von 40, 130 bzw. 650 Nukleotiden Länge enthielt, wurden mit 9 Einheiten recBC Enzym in 200 µl Reaktionsgemisch (mit 0,5 mM ATP) inkubiert. Nach 30 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA beendet und 50 µl wurden zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte entnommen. Die verbliebenen 150 µl -Reaktionsansätze wurden zusammen mit einer Probe von λ^{32}p DNA auf neutrale Saccharosegradienten gegeben und 3 Stunden bei 50 000 Upm im SW60 TI Rotor zentrifugiert. Pro Gradient wurden 40 Fraktionen gesammelt und die Verteilung der Radioaktivität (^{32}p und ^{3}H) bestimmt. Der Anteil der [^{3}H]DNA, welche in einem symmetrischen Peak von 21,5 S sedimentierte, wurde als nicht degradierte zirkuläre DNA betrachtet. Das restliche ^{3}H-markierte Material sedimentierte nahe dem Meniskus der Gradienten und wurde als Summe der säurelöslichen Produkte und säureunlöslichen Fragmente gewertet. Der Anteil säureunlöslicher Fragmente wurde aus der Menge dieses Materials, vermindert um den Anteil säurelöslicher Nukleotide (s.o.), berechnet.

16-fache nicht beeinflußt. Demnach scheint die Länge der einzelsträngigen Regionen für die Degradierung von zirkulärer DNA durch das recBC Enzym in vitro von untergeordneter Bedeutung zu sein. Dieses überraschende Ergebnis läßt vermuten, daß die Reaktion des Enzyms mit den partiell einzelsträngigen DNA-Substraten spezifischer ist als zu erwarten wäre, wenn vorwiegend der einzelsträngige DNA-Bereich vom Enzym erkannt und geschnitten würde. Möglicherweise trägt der doppelsträngige DNA-Bereich wesentlich zur Erkennung der Strang-Lücken bei. Auf diese Interpretation der Befunde wird im nächsten Abschnitt noch näher eingegangen.

2.3 Degradierung von linearer Doppelstrang-DNA mit einzelsträngigen Enden

Nach eigenen Befunden und nach Untersuchungen von Goldmark und Linn (1972) sind die Einzelstrang- spezifischen Aktivitäten des recBC Enzyms (sowohl die Endonuklease als auch die Exonuklease) schwächer als die exonukleolytische Aktivität mit doppelsträngiger DNA. Die Degradierung von zirkulärer DNA mit einzelsträngigen Regionen wird vermutlich durch die schwache endonukleolytische Aktivität des Enzyms begrenzt. Es ergab sich die Frage, ob auch lineare Doppelstrang-DNA vom recBC Enzym mit reduzierter Rate degradiert wird, wenn die Degradierung der DNA an einzelsträngigen Enden initiiert werden muß.

Lineare DNA-Substrate mit einzelsträngigen Enden definierter Länge (zwischen 20 und 850 Nukleotiden) wurden aus P22 [^{3}H]DNA mit Exonuklease III aus E. coli bzw. mit λ Exo-

nuklease präpariert (s. Absch. III 5.2). Die mit Exonuklease III partiell degradierten DNA-Moleküle enthielten 5'Phosphat Enden, die mit λ Exonuklease behandelten einzelsträngige 3'OH Enden. Es zeigte sich, daß die Degradierung von doppelsträngiger DNA durch das recBC Enzym bereits durch relativ kurze einzelsträngige Enden behindert wird. Abbildung 10 zeigt die Abnahme der Degradierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Länge der einzelsträngigen Enden an den DNA-Molekülen. Im Längenbereich zwischen etwa 20 und 100 Nukleotiden nahm die Degradierungsrate mit zunehmender Länge der Einzelstrangenden kontinuierlich bis auf 1/10 der mit nativer DNA gemessenen Rate ab. Durch eine weitere Verlängerung der einzelsträngigen Enden bis auf 850 Nukleotide ließ sich diese "Minimalrate" nicht weiter reduzieren, sondern blieb konstant. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Polarität der einzelsträngigen Enden. Der etwas unterschiedliche Verlauf der Kurven in Abb. 10 ist wahrscheinlich nicht so zu interpretieren, daß DNA mit einzelsträngigen 3'OH Enden für das recBC Enzym ein besser degradierbares Substrat darstellt. Frühere Untersuchungen zur Degradierung von einzelsträngiger DNA mit verschiedenen Endgruppen hatten nämlich keinen Hinweis auf eine besondere Präferenz des recBC Enzyms für eine bestimmte Endgruppe ergeben (Karu et al., 1973). Wahrscheinlicher ist vielmehr, daß das mit λ Exonuklease präparierte DNA-Substrat einen geringen Anteil nativer DNA-Moleküle enthielt, die vom recBC Enzym bevorzugt degradiert werden. Da λ Exonuklease, im Gegensatz zur Exonuklease III, die DNA prozessiv degradiert, wäre eine 100 %ige Sättigung der DNA mit Enzym bei der Präparation notwendig

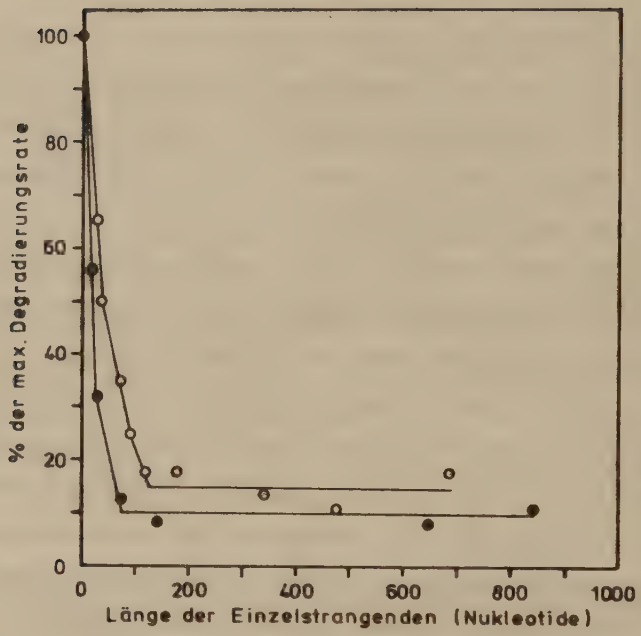

Abb. 10 : Die Degradierung von P22 DNA mit einzelsträngigen Enden unterschiedlicher Länge und Polarität.

Die ^{3}H-markierten DNA-Substrate enthielten einzelsträngige 5'Phosphat Enden (•) bzw. 3'OH Enden (o) der jeweils angegebenen Länge. Es wurden 15 nMol der DNA-Substrate mit 1,5 Einheiten recBC Enzym in 5-fachen Reaktionsansätzen bei 37°C inkubiert. Nach 5, 10, 20 und 30 Minuten wurden je 0,3 ml zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte entnommen. Der Anstieg an säurelöslichen Produkten war mit allen getesteten DNA-Substraten während der ersten 10 Minuten linear; daher wurden die Degradierungsraten nach dem 10 min-Wert berechnet.

gewesen, um eine völlig gleichmäßige Degradierung aller DNA-Enden zu erreichen.

Das folgende Experiment mit gemischten Substraten bestätigte die in Abb. 10 zusammengefaßten Ergebnisse und zeigte noch deutlicher die Präferenz des recBC Enzyms für native doppelsträngige DNA gegenüber doppelsträngiger DNA mit einzelsträngigen Enden. Es wurde ^{32}P-markierte λ DNA ($M_r = 31 \times 10^6$), die natürliche 5'Einzelstrangenden von 12 Nukleotiden Länge aufweist (Wu und Tailor, 1971), mit der gleichen Menge ^{3}H-markierter P22 DNA gemischt. Die P22 DNA war entweder nativ oder besaß einzelsträngige 5'Enden von unterschiedlicher Länge (zwischen 20 und 650 Nukleotiden). Die gleichzeitige Degradierung der beiden DNA-Substrate mit unterschiedlicher radioaktiver Markierung wurde anhand der freigesetzten säurelöslichen Produkte verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Vollständig doppelsträngige P22 DNA wurde in Gegenwart der λ DNA bevorzugt degradiert. Das Verhältnis von degradierter λ DNA und P22 DNA änderte sich jedoch zugunsten der λ DNA, sobald die P22 DNA ebenfalls einzelsträngige Enden aufwies. Mit zunehmender Länge der Einzelstrangenden nahm die kompetitive Wirkung der P22 DNA ab. In einem Gemisch aus λ DNA und P22 DNA, die Einzelstrangenden von 145 oder 650 Nukleotiden Länge aufwies, wurde ausschließlich die λ DNA degradiert. (Die Tatsache, daß die P22 DNA unter diesen Bedingungen überhaupt nicht degradiert wurde, zeigte auch, daß diese DNA-Präparate keine signifikanten Mengen nativer Moleküle enthielten.)

Aufgrund der angeführten Beobachtungen ist festzustellen, daß einzelsträngige DNA-Enden offenbar für das recBC Enzym ein

Länge der einzelsträngigen 5'Phosphat Enden in der P22 DNA	Säurelösliche DNA		Verhältnis der degradierten DNA (λ /P22)
	P22 DNA	λ DNA	
Nukleotide	nMol		
0	0,25	0,087	0,35
20	0,125	0,125	1
30	0,115	0,2	1,7
75	0,033	0,145	4,4
145	≤ 0,005	0,125	≥ 25
650	≤ 0,005	0,225	≥ 45

Tabelle 5 : Die Degradierung eines Gemisches aus λ DNA und P22 DNA mit einzelsträngigen Enden verschiedener Länge.

15 nMol P22 [^{3}H] DNA mit einzelsträngigen 5'Phosphat Enden der angegebenen Länge und 15 nMol λ [^{32}P] DNA wurden mit 3 Einheiten recBC Enzym in 6-fachen Reaktionsansätzen bei 37°C inkubiert. Nach 0, 5, 10, 20 und 30 Minuten wurden Proben von 0,3 ml entnommen und der Anteil säurelöslicher [^{3}H] DNA und [^{32}P] DNA ermittelt. In der Tabelle sind die Werte aufgeführt, die nach 30-minütiger Inkubation erhalten wurden. In Kontrollreaktionen, die doppelte Mengen nur eines DNA-Substrates enthielten (native P22 DNA bzw. λ DNA), wurden durch die gleiche Enzymmenge in 30 Minuten 0,36 nMol P22 DNA bzw. 0,22 nMol λ DNA zu säurelöslichen Produkten degradiert.

schlechtes Substrat darstellen; sowohl die exonukleolytische als auch die endonukleolytische Entfernung von Einzelstrangenden scheint wenig effektiv zu erfolgen, insbesondere bei einzelsträngigen Enden von mehr als 100 Nukleotiden Länge. Es ergab sich eine auffällige Übereinstimmung zwischen der langsamen Degradierung von linearer DNA mit einzelsträngigen Enden von etwa 100 bis zu 850 Nukleotiden Länge und den zirkulären DNA-Substraten mit Lücken. In beiden Fällen ist die Initiation der DNA-Degradierung an den internen oder terminalen Strang-Lücken, unabhängig von deren Länge, etwa 10-fach niedriger als an doppelsträngigen DNA-Enden. [Da die P22 DNA zirkulär permutiert ist und redundante Enden besitzt (Susskind und Botstein, 1978), wurde durch Saccharosegradienten-Zentrifugation geprüft, ob die DNA spontan gebildete ringförmige Moleküle (die ja relativ resistent gegen das recBC Enzym sind) enthielten. Das war nicht der Fall. Aus Abb. 10 ist zu schließen, daß lineare DNA mit einzelsträngigen Enden offenbar von dem recBC Enzym als ein Substrat erkannt wird, welches ähnliche strukturelle Eigenschaften aufweist wie zirkuläre DNA mit Einzelstrang-Lücken, und vermutlich aus diesem Grunde erfolgt die Initiation der Degradierung dieser DNA-Substrate mit ähnlich niedriger Rate. Die Ähnlichkeit in der Struktur könnte darin bestehen, daß mit zunehmender Länge der einzelsträngigen Enden und deren damit verbundener Verknäuelung die Anzahl freier Enden reduziert wird. Die Degradierung der DNA würde dann hauptsächlich endonukleolytisch initiiert.

Die in Abschnitt 2.2 beschriebene langsame Degradierung von zirkulären DNA-Substraten mit einzelsträngigen Regionen

sehr unterschiedlicher Länge ließ vermuten, daß ein endonukleolytischer Einschnitt nicht zufallsverteilt im gesamten einzelsträngigen Bereich der DNA erfolgt. Große einzelsträngige Regionen werden nicht häufiger endonukleolytisch gespalten als kleine. Auch die linearen Zwischenprodukte werden nachfolgend mit gleicher Rate zu niedermolekularen Produkten degradiert, was wahrscheinlich nicht zu erwarten wäre, wenn vom Enzym zunächst lineare Moleküle mit je zwei langen einzelsträngigen Enden freigesetzt würden. Dies alles deutet darauf hin, daß vorwiegend lineare Moleküle mit doppelsträngigen Enden oder kurzen einzelsträngigen Enden gebildet werden, unabhängig von der Größe der gespaltenen Einzelstrang-Lücke. Aufgrund dieser Befunde kann man vermuten, daß das Enzym wegen seiner Präferenz für doppelsträngige DNA eine besondere Affinität zum Übergangsbereich zwischen einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA besitzt und die DNA bevorzugt in dieser Region spaltet. In diesem Fall wäre die Erkennung dieser Region von der Länge des Einzelstrang-Bereiches unabhängig. Dies wird durch die Experimente bestätigt.

Aufgrund der vorausgegangenen Überlegung war eine interessante Frage, ob das recBC Enzym mit Lücken enthaltender zirkulärer DNA auch dann reagiert, wenn seine Einzelstrang-spezifische endonukleolytische Aktivität durch Ca^{2+} inhibiert ist. Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Versuche zeigten, daß dies tatsächlich der Fall ist.

3. Die Reaktion des recBC Enzyms mit zirkulärer Doppelstrang-DNA unter Bedingungen minimaler nukleolytischer Aktivität

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt wurde, läßt sich die Aktivität des recBC Enzyms in vitro durch Ca^{2+}-Ionen verändern (Rosamond et al., 1979). Dabei wirkt die Gegenwart von Ca^{2+} vor allem inhibierend auf die nukleolytischen Aktivitäten des Enzyms, während sowohl die ATPase-Aktivität des Enzyms als auch die DNA-Entwindeaktivität unter diesen Bedingungen erhalten bleiben. Die Einzelstrang- spezifischen nukleolytischen Aktivitäten des Enzyms, Exonuklease und Endonuklease, werden durch Ca^{2+} vollständig inhibiert. Es tritt aber bei der Entwindung von doppelsträngiger DNA eine geringe nukleolytische Aktivität auf, die sich auf die Hydrolyse weniger Phosphodiesterbindungen beschränkt (eine Bindung pro ca. 4000 Nukleotidpaaren; Rosamond et al., 1979). Deshalb bleibt ein DNA-Molekül, das vorübergehend enzymatisch entwunden wurde, mit Ausnahme der wenigen Einzelstrangbrüche intakt. Mit anderen Worten, in Gegenwart von Ca^{2+} wirkt das recBC Enzym hauptsächlich als ATP-abhängiges DNA-Entwindeenzym. Die bisherigen Untersuchungen von Rosamond et al. wurden nur mit linearer doppelsträngiger DNA durchgeführt, die aber in vivo ein ungewöhnliches DNA-Substrat darstellt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Enzym in Gegenwart von Ca^{2+} auch zirkuläre DNA von Einzelstrang-Lücken ausgehend entwindet, oder ob solche zirkulären DNA-Moleküle bei vollständiger Inhibition der Einzelstrang- spezifischen Endonuklease-Aktivität für das Enzym ein nicht-angreifbares Substrat darstellen.

3.1 Charakterisierung der nukleolytischen Aktivitäten in Gegenwart von Ca^{2+}

Die von Rosamond et al. (1979) beschriebene Teil-Inhibition des recBC Enzyms durch Ca^{2+} ließ sich mit dem Enzympräparat, das in dieser Arbeit verwendet wurde, weitgehend reproduzieren. $CaCl_2$ -Konzentrationen zwischen 1 und 10 mM (zusammen mit 1 mM $MgCl_2$) führten in Verbindung mit hohen ATP-Konzentrationen (5 mM) zum völligen Verlust der exonukleolytischen Aktivitäten des Enzyms: säurelösliche Produkte wurden weder aus einzelsträngiger DNA noch aus doppelsträngiger DNA freigesetzt. Die endonukleolytische Aktivität wurde mit einzelsträngiger zirkulärer fd DNA (M_r = 1,9 x 10^6) getestet. Lineare fd DNA kann von der zirkulären Form aufgrund der etwas langsameren Sedimentation in alkalischen Saccharosegradienten unterschieden werden (Rosamond et al., 1979). Aus Abb. 11 ist ersichtlich, daß die Endonuklease-Aktivität durch Ca^{2+} stark inhibiert wurde. Während in der Kontrollreaktion mit 10 mM Mg^{2+} ein großer Teil der DNA (40 %) endo- und exonukleolytisch gespalten wurde (Abb. 11 A), blieb fd DNA, die mit der gleichen Enzymmenge in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+} inkubiert wurde, zirkulär (Abb. 11 B). Bei Einsatz von 10 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+} war eine sehr geringe endonukleolytische Aktivität nachweisbar (Abb. 11 C; leichte Schulter bei Fraktion 25-30).

Die Entwindeaktivität des recBC Enzyms mit doppelsträngiger DNA wurde zunächst mit linearer P22 DNA überprüft. Da das recBC Enzym die DNA zwar vorübergehend entwindet, aber nicht vollständig denaturiert (s. Abb. 1), kann die DNA-Ent-

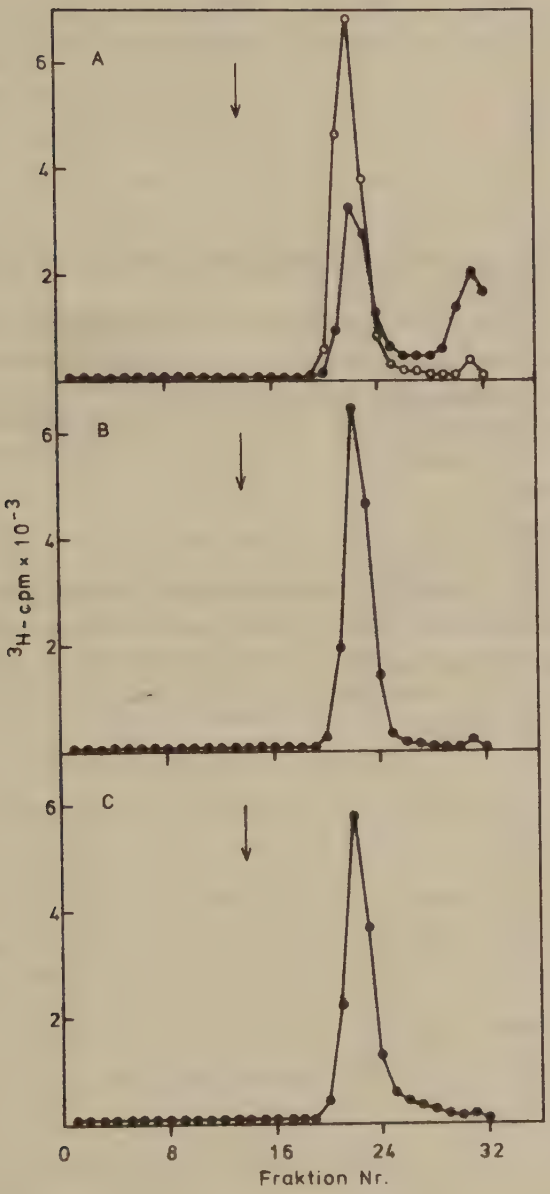

Abb. 11

Abb. 11: Verlust der Endonuklease-Aktivität des recBC Enzyms durch Ca^{2+}

2,3 nMol fd[^{3}H]DNA wurden mit 11 Einheiten recBC Enzym (●), bzw. ohne recBC Enzym (○) in 0,1 ml Reaktionsgemisch (s. Absch. III 7.1) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die ATP-Konzentration war 5 mM. Die Konzentration der Kationen war folgende:

A) 10 mM Mg^{2+}

B) 1 mM Mg^{2+}, 1 mM Ca^{2+}

C) 1 mM Mg^{2+}, 10 mM Ca^{2+}

Nach Zugabe von EDTA (Endkonzentration 40 mM) wurden die Proben zusammen mit λ ^{32}P DNA auf alkalische Saccharosegradienten aufgetragen und 3 Stunden bei 50 000 Upm im SW60 TI Rotor zentrifugiert. Der Pfeil markiert die Position der λ DNA.

windungsaktivität nicht unmittelbar gemessen werden. Ein direkter Test ist nur möglich, wenn man dem Reaktionsansatz DNA-Bindeprotein von E. coli zusetzt, das eine Renaturierung der DNA verhindert (Rosamond et al., 1979). Dieser Test war aber für die geplanten Versuche mit der zirkulären DNA nicht anwendbar, da das DNA-Bindeprotein an die einzelsträngigen Regionen in der DNA bindet und diese für das recBC Enzym unerkennbar macht (McKay und Linn, 1976). Daher wurde als Test auf Entwindungsaktivität die restliche nukleolytische Aktivität herangezogen, die unter den Versuchsbedingungen mit Ca^{2+} erhalten bleibt. Es wurde geprüft, ob die DNA nach Inkubation mit dem recBC Enzym Einzelstrangbrüche aufwies. [Aus Kontrollexperimenten und Vorversuchen war bereits bekannt, daß das hier verwendete Enzympräparat keine Spuren von kontaminierenden Endonukleasen mit doppelsträngiger DNA als Substrat enthielt. In diesen Versuchen waren Mg^{2+} und Ca^{2+} in den Konzentrationen wie in den folgenden Versuchen und native zirkuläre PM2 DNA als Substrat verwendet worden.]

Wenn die lineare P22 DNA mit dem recBC Enzym in Gegenwart von Ca^{2+} und 5 mM ATP inkubiert wurde, sedimentierte danach tatsächlich ein Teil der DNA in alkalischen Saccharosegradienten mit reduzierter Geschwindigkeit, wies also Strangbrüche auf. Das mittlere Molekulargewicht der Einzelstrang-Fragmente wurde mit $\lambda\,^{32}P$ DNA als Sedimentationsmarker nach der Formel von Burgi und Hershey (1963) berechnet. Die mittlere Anzahl von Einzelstrangbrüchen pro DNA-Molekül war von der Konzentration der Ca^{2+}-Ionen abhängig. Bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration (1 mM) wurde ein Wert von ca. 30 Brüchen

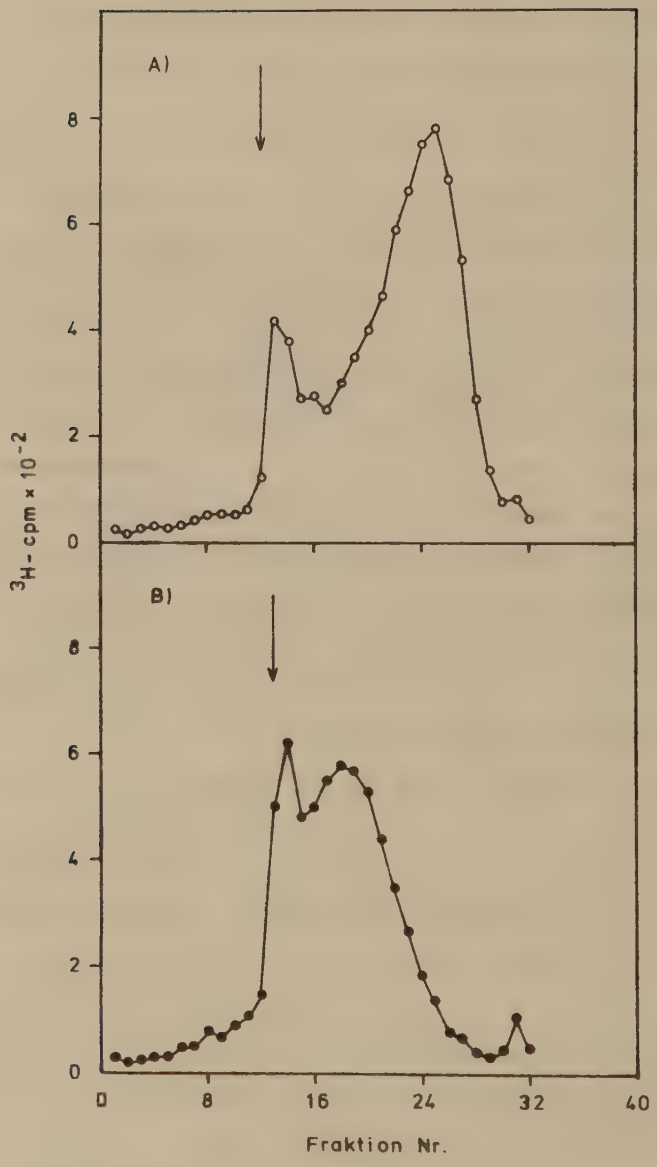

Abb. 12

Abb. 12: Die nukleolytische Aktivität des recBC Enzyms mit doppelsträngiger P22 DNA in Gegenwart von Ca^{2+}. Die P22 [^{3}H]DNA (50 nMol) wurde mit 60 Einheiten recBC Enzym 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch enthielt 5 mM ATP, 1 mM $MgCl_2$ und 10 mM $CaCl_2$. Zur Inaktivierung des recBC Enzyms wurde die DNA phenolisiert. Nach ausgiebiger Dialyse wurde ein Teil der DNA mit T4 DNA-Ligase 1 Stunde bei 37°C inkubiert (Absch. III 7.5). 4 nMol des DNA-Präparats vor (A) und 3,2 nMol nach Ligase -Behandlung (B) wurden in alkalischen Saccharosegradienten zentrifugiert (3 h bei 50 000 Upm im SW60 TI Rotor). Der Pfeil markiert die Sedimentation von λ^{32}P DNA im gleichen Gradienten.

pro P22 DNA-Strang ermittelt. Bei einer Konzentration von 10 mM Ca^{2+} induzierte das Enzym nur noch ca. 10 Brüche pro DNA-Strang (Abb. 12 A). Es zeigte sich also, daß die Messung der Einzelstrangbrüche als indirekter Test für die Entwindungsaktivität geeignet war.

Die vom recBC Enzym während der DNA-Entwindung induzierten Einzelstrangbrüche sind durch Desoxypolynukleotid-Ligase reparierbar. Dies zeigte das in Abb. 12 dargestellte Experiment. Die für den DNA-Ligase Test verwendete P22 DNA wurde mit dem recBC Enzym in Gegenwart von 10 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+} inkubiert und enthielt ca. 10 Brüche pro DNA-Strang (Abb. 12 A; Fraktion 17-32). Etwa 27 % der DNA-Stränge wiesen noch das ursprüngliche Molekulargewicht auf (Fraktion 1-16); vermutlich handelte es sich dabei um DNA, die vom recBC Enzym nicht entwunden worden war. Nach Behandlung mit der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 von E. coli (Weiss et al., 1968; Panet et al., 1973) wurde die DNA wiederum in alkalischer Saccharose zentrifugiert. Der Anteil unfragmentierter DNA-Stränge in der Ligase- behandelten DNA betrug jetzt 40 % und die restliche DNA enthielt nur noch durchschnittlich 2 Brüche pro DNA-Strang (Abb. 12 B). Der überwiegende Teil (mindestens 90 %) der vom recBC Enzym produzierten Einzelstrangbrüche war also durch DNA-Ligase- Behandlung innerhalb von 60 Minuten zu reparieren und besaß daher 3'OH und 5'Phosphat Endgruppen. Das Experiment zeigte außerdem, daß die DNA während der Inkubation mit dem recBC Enzym in Gegenwart von Ca^{2+} doppelsträngig geblieben ist, denn eine effektive Ligation von Strangbrüchen erfolgt nur im DNA-Doppelstrang.

3.2 Entwindung von zirkulärer DNA in Gegenwart von Ca^{2+}

Unter den in dieser Arbeit verwendeten Reaktionsbedingungen wies das recBC Enzym mit doppelsträngiger DNA eine etwas höhere nukleolytische Aktivität auf als von Rosamond et al. (1979) beschrieben wurde. Nach Rosamond et al. produziert das Enzym in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+} etwa 1 Strangbruch pro 4000 Nukleotidpaare. In den oben beschriebenen Experimenten wurde bei der gleichen Kationen-Konzentration eine ca. 6-fach höhere Aktivität gemessen. Aus diesem Grunde war es möglich, auch mit den relativ kleinen PM2 DNA-Molekülen ($M_r = 6 \times 10^6$; entsprechend 8600 Nukleotidpaare) die nukleolytische Aktivität als Maßstab für die Fähigkeit des Enzyms zur DNA-Entwindung experimentell zu nutzen.

Für diese Versuche wurde ein PM2 DNA-Substrat herangezogen, das im Durchschnitt pro Molekül eine Einzelstrang-Lücke von 200 Nukleotiden Länge enthielt. Dieses Substrat wurde vor und nach Behandlung mit dem recBC Enzym durch Sedimentation in neutralen (Messung von Doppelstrangbrüchen) und alkalischen Saccharosegradienten (Messung von Einzelstrangbrüchen) charakterisiert. Entsprechend statistischer Erwartung wies ein Teil der DNA keine Strangbrüche auf, sondern bestand aus kovalent geschlossenen zirkulären Molekülen, die im neutralen Saccharosegradient mit einem S-Wert von 26,5 sedimentieren (Abb. 13 D, Fraktion 16-18). Ein geringer Teil der DNA (12 %) enthielt erwartungsgemäß zwei oder mehr Einzelstrang-Lücken pro Molekül; diese DNA ist durch Zentrifugation in alkalischen Saccharosegradienten von der DNA mit nur einer Strang-Lücke unterscheidbar (Abb. 13 A, Fraktion 24-28). Die Gesamtheit der DNA

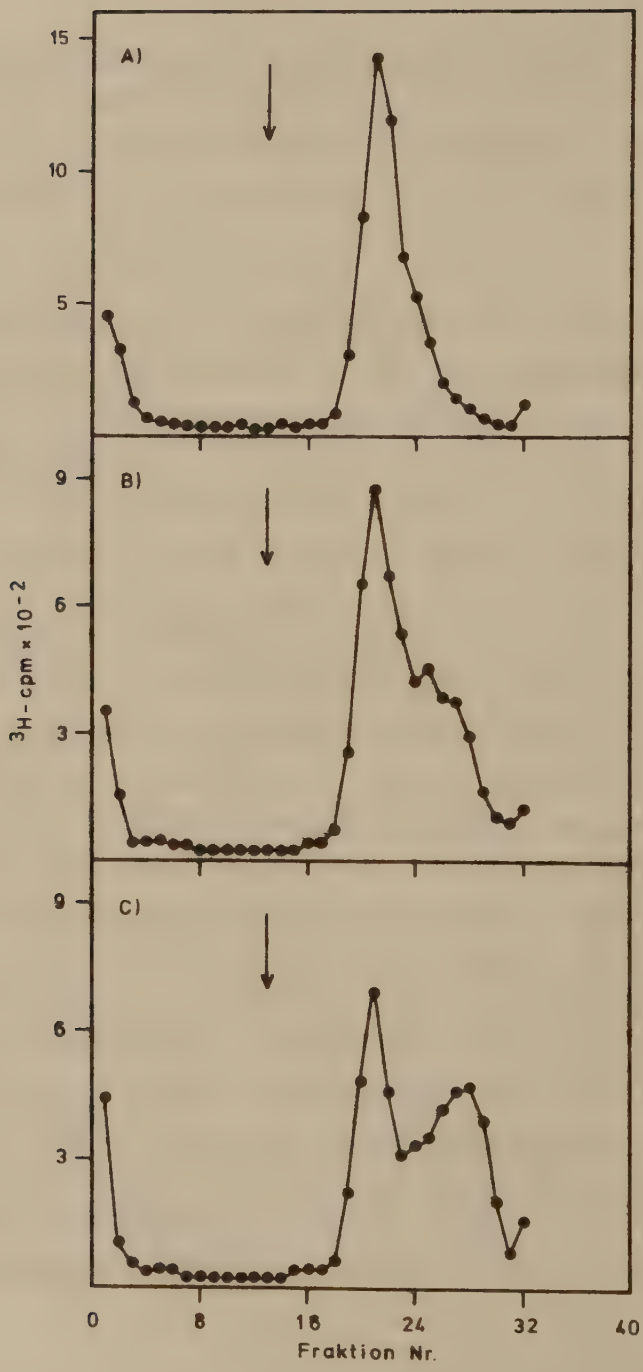

Abb. 13

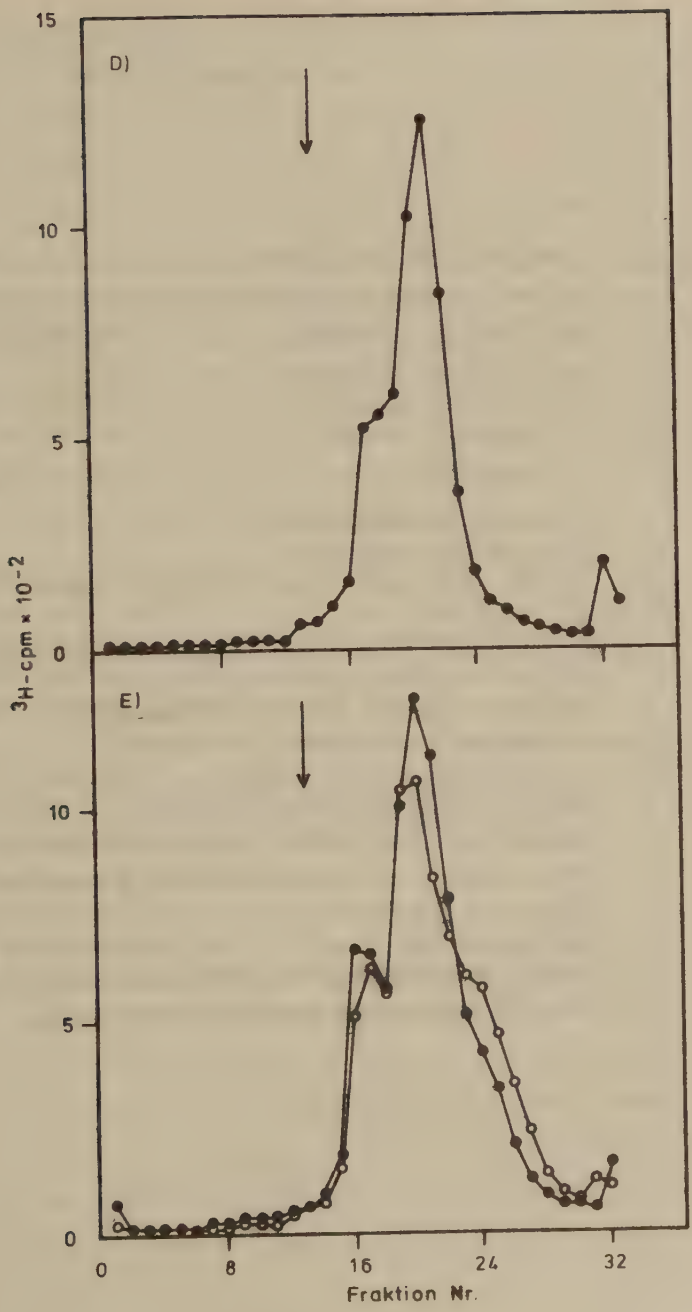

Abb. 13

Abb. 13: Sedimentation von PM2 DNA in alkalischen und neutralen Saccharosegradienten nach Inkubation mit dem recBC Enzym in Gegenwart von Ca^{2+} und Mg^{2+}.

A,B,C: Alkalische Gradienten
A) Kontrolle ohne Enzym
B) 1 mM Mg^{2+}, 1 mM Ca^{2+}
C) 1 mM Mg^{2+}, 10 mM Ca^{2+}

D,E: Neutrale Gradienten
D) Kontrolle ohne Enzym
E) (●) 1 mM Mg^{2+}, 1 mM Ca^{2+}; (○) 1 mM Mg^{2+}, 10 mM Ca^{2+}

7 nMol ^{3}H-markierte PM2 DNA (durchschnittlich eine Strang-Lücke pro DNA-Molekül) wurden in 0,3 ml Reaktionsansätzen mit 44 Einheiten recBC Enzym (bzw. in der Kontrolle ohne Enzym) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze enthielten 5 mM ATP und zweiwertige Kationen wie oben angegeben. Nach beendeter Inkubation wurde EDTA im Überschuß zugesetzt und je ein neutraler und ein alkalischer Saccharosegradient wurde mit der Hälfte eines Reaktionsansatzes beladen. Die Gradienten wurden 3 h bei 50 000 Upm im SW60 TI Rotor zentrifugiert. Der Pfeil markiert die Position von $\lambda^{32}P$ DNA in den gleichen Gradienten.

sedimentierte in neutraler Saccharose mit ≥ 21,5 S und war damit als zirkuläre DNA charakterisiert (in einem Kontrollversuch sedimentierte die DNA nach Behandlung mit der Einzelstrang- spezifischen Endonuklease S1 mit 19,5 S). Die auf diese Weise charakterisierte Population von DNA-Molekülen zeigte nach Inkubation mit dem recBC Enzym in Gegenwart von Ca^{2+} ein verändertes Sedimentationsverhalten sowohl in alkalischen als auch in neutralen Saccharosegradienten. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C mit 6 Enzymeinheiten pro nMol DNA wies ein Teil der DNA eine beträchtlich erhöhte Anzahl von Einzelstrangbrüchen auf (Abb. 13 B,C). Verglichen mit der unbehandelten DNA (Abb. 13 A) stieg der Anteil von Molekülen mit mehr als einem Strangbruch nach Inkubation mit 1 mM Ca^{2+} von 12 % auf 26 % (Abb. 13 B) und nach Inkubation mit 10 mM Ca^{2+} auf 46 % der Gesamt-DNA (Abb. 13 C). Bei der höheren Kationen-Konzentration von 11 mM (10 mM Ca^{2+}, 1 mM Mg^{2+}) ist das recBC Enzym aktiver als bei niedrigen Konzentrationen von 2 mM; deshalb wurde mit der hohen $CaCl_2$ -Konzentration sowohl eine etwas höhere Aktivität mit der PM2 DNA als auch eine geringe endonukleolytische Aktivität mit fd DNA beobachtet (Abb. 11 C).

Die Sedimentation der mit dem recBC Enzym behandelten PM2 DNA in neutralen Saccharosegradienten zeigte, daß sie nicht mehr zirkulär war, sondern in Form von linear vollständigen Molekülen und kleineren Fragmenten vorlag (Abb. 13 E, Schulter in Fraktion 22-29). Da lineare P22 DNA unter gleichen Reaktionsbedingungen nicht in Fragmente zerlegt worden war (keine Abb.; s. auch Rosamond et al., 1979), ist anzunehmen,

daß die zirkulären PM2 DNA-Moleküle in ihren einzelsträngigen DNA-Bereichen zerschnitten wurden. Wie ist dies denkbar unter Berücksichtigung der Tatsache, daß unter den gleichen Versuchsbedingungen keine (bzw. nur eine sehr geringe) endonukleolytische Aktivität mit einzelsträngiger fd DNA meßbar war ? Die in Absch. 2 beschriebenen Versuchsergebnisse ließen bereits vermuten, daß Einzelstrang-Lücken von dem recBC Enzym als ein Substrat erkannt werden, das sich aufgrund der angrenzenden doppelsträngigen DNA-Bereiche von vollständig einzelsträngiger DNA unterscheidet. Vermutlich wurden die PM2 DNA-Moleküle aufgrund der spezifischen Struktur an den Strang-Lücken häufiger als Substrat erkannt und endonukleolytisch gespalten als die vollständig einzelsträngige fd DNA.

4. Untersuchungen zum Einfluß des recA Proteins auf die nukleolytischen Aktivitäten des recBC Enzyms

Die Eigenschaften und enzymatischen Aktivitäten des recA Proteins wurden bereits in der Einleitung ausführlich behandelt. Im Zusammenhang mit dem recBC Enzym könnte vor allem die Fähigkeit des recA Proteins, an einzelsträngige DNA zu binden, von Bedeutung sein. Die Fragestellung war, ob das recA Protein einzelsträngige DNA vor DNasen schützt, in diesem Fall speziell gegen die DNase Aktivitäten des recBC Enzyms. Daß einzelsträngige DNA durch Komplexbildung mit einem anderen Protein, dem DNA Bindeprotein von E. coli, gegen die recBC DNase wirksam geschützt werden kann, wurde von McKay und Linn (1976) in vitro gezeigt.

4.1 Testbedingungen für die Bindung des recA Proteins an einzelsträngige DNA und an zirkuläre Doppelstrang-DNA mit einzelsträngigen Regionen

Kürzlich wurde berichtet, daß das recA Protein kooperativ an einzelsträngige DNA und an Einzelstrang-Lücken in doppelsträngiger DNA bindet (West et al., 1980). Für die Bindung an die DNA ist Mg^{2+} erforderlich, jedoch nicht die Hydrolyse eines Nukleosidtriphosphats (Gudas und Pardee, 1975; Shibata et al., 1979 b; McEntee et al., 1979; West et al., 1980). Es wurde beobachtet, daß die Bindung des recA Proteins an einzelsträngige DNA in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten oder in Gegenwart des Analogons ATP-γ-S (Adenosin 5'-O-(3-thio)triphosphat) sogar wesentlich stärker ist (Shibata et al., 1979 b; West et al., 1980). Es wird angenommen, daß die Hydrolyse des ATP bei der Dissoziation des recA Proteins von der DNA erfolgt,

daher haben die hydrolysierbaren Nukleosidtriphosphate einen destabilisierenden Einfluß auf die DNA-Bindung (Shibata et al., 1979 b; McEntee et al., 1979).

Für die beabsichtigten Experimente wurde als Nukleosidtriphosphat für das recBC Enzym GTP gewählt, das für das recBC Enzym einen ebenso wirksamen Kofaktor darstellt wie ATP (Wright et al., 1971). Vom recA Protein wird jedoch GTP mit 10-fach niedrigerer Rate hydrolysiert als ATP (Weinstock et al., 1979; Ogawa et al., 1978). Eine Inhibition des recBC Enzyms durch Hydrolyse des Nukleosidtriphosphats durch das recA Protein wurde somit gering gehalten.

Weil über die DNA-Bindungseigenschaften des recA Proteins in Gegenwart von GTP bisher nichts bekannt war, wurde die Bindung an einzelsträngige DNA unter den für die späteren Versuche erforderlichen Bedingungen überprüft (die genaue Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Absch. III 7.8 aufgeführt). Für diesen Test wurde einzelsträngige fd DNA mit sättigenden Konzentrationen an recA Protein inkubiert. Die gebildeten Protein-DNA Komplexe wurden durch Zentrifugation in neutralen Saccharosegradienten charakterisiert. [Zur Sättigung der Einzelstrang-DNA wird etwa 1 recA Protein Monomer pro 5 Nukleotide benötigt; dies entspricht etwa 8 µg Protein pro nMol DNA (Shibata et al., 1979 a,b; West et al., 1980).] Abb. 14 zeigt die Sedimentation von fd DNA nach Inkubation mit 18 µg recA Protein pro nMol DNA in Gegenwart von GTP (B), ATP (C), ATP-γ-S (E) oder in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten (D). In Gegenwart von ATP-γ-S oder nur Mg^{2+} wurde die Sedimentations-Geschwindigkeit der DNA durch das gebundene

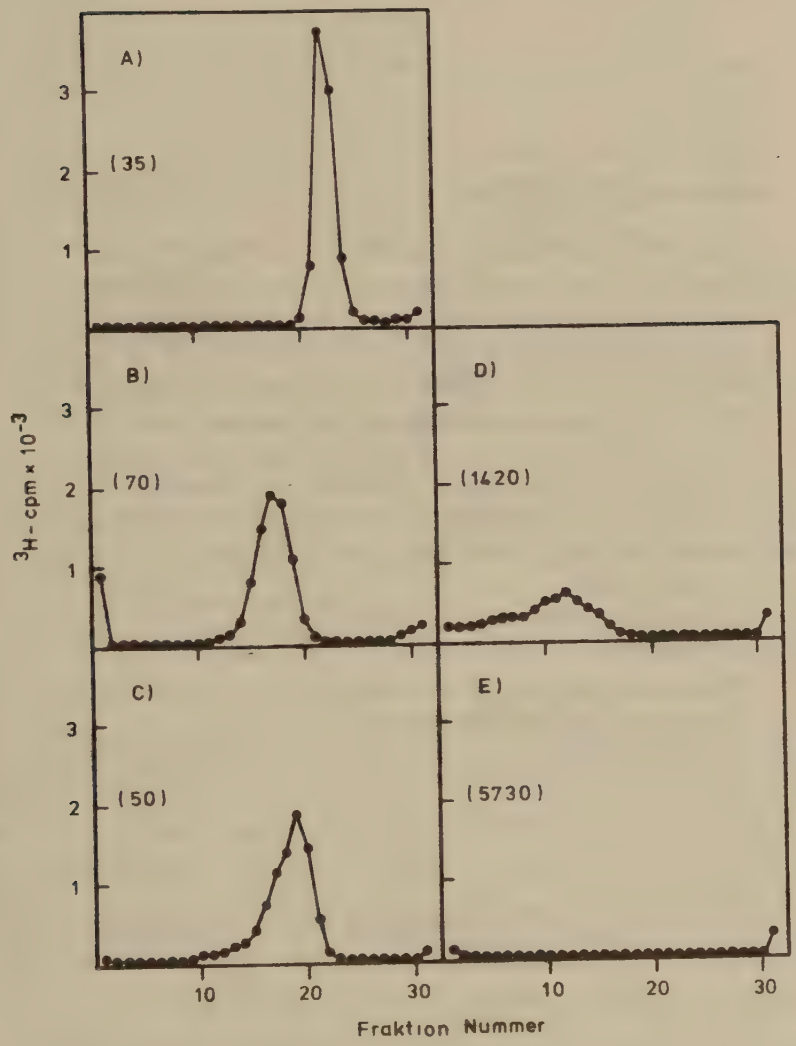

Abb. 14

Abb. 14: Sedimentation von Komplexen aus recA Protein und fd DNA.

1,15 nMol fd [^{3}H] DNA wurden mit 21 µg recA Protein in 100 µl- Reaktionsansätzen 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden ohne Zugabe von EDTA auf neutrale 5-20 %ige Saccharosegradienten geladen und 90 Minuten bei 50000 Upm im SW60 TI Rotor bei 4°C zentrifugiert. Von jedem Gradienten wurden 31 Fraktionen gesammelt, zusätzlich wurde die Radioaktivität auf dem Boden der Röhrchen gemessen (Zahlen in den Klammern). Das Standard-Reaktionsgemisch enthielt 10 mM $MgCl_2$ und folgende Nukleosidtriphosphate:

A) Kontrolle ohne recA Protein
B) 1 mM GTP
C) 2 mM ATP
D) ohne Nukleosidtriphosphat
E) 0,5 mM ATP-γ-S

Protein so erhöht, daß sich die gesamte DNA bzw. ein großer Teil der DNA nach beendeter Zentrifugation auf dem Boden der Röhrchen befand (in Abb. 14 geben die Zahlen in den Klammern die auf den Röhrchen-Böden gemessene Radioaktivität an). Im Vergleich zu freier fd DNA und den in Abwesenheit von hydrolysierbaren Nukleosidtriphosphaten gebildeten sehr stabilen Protein-DNA Komplexen, sedimentierten die in Gegenwart von GTP und ATP gebildeten Protein-DNA Komplexe mit intermediärer Geschwindigkeit. Die Bindung des recA Proteins an einzelsträngige DNA scheint also in Gegenwart von GTP und ATP recht ähnlich zu sein. Jedoch war die Sedimentationsrate der fd DNA nach Inkubation mit dem recA Protein in Gegenwart von GTP etwas höher als in Gegenwart von ATP. Demnach bindet in Gegenwart von GTP mindestens genauso viel recA Protein an die DNA wie in Gegenwart von ATP.

Die Bindung des recA Proteins an einzelsträngige Regionen in doppelsträngiger DNA wurde mit zirkulärer PM2 DNA untersucht, die pro DNA-Molekül durchschnittlich 2,7 Einzelstrang-Lücken von 200 Nukleotiden Länge enthielt. Diese DNA sedimentierte nach Inkubation mit dem recA Protein und GTP ebenfalls mit intermediärer Rate im Vergleich zu freier DNA und zu DNA, welche mit dem recA Protein und nur Mg^{2+} inkubiert wurde (Abb. 15).

Aus den Experimenten kann geschlossen werden, daß unter den Standard-Reaktionsbedingungen, also in Gegenwart von GTP, das recA Protein sowohl an einzelsträngige DNA als auch an Einzelstrang-Lücken in doppelsträngiger DNA bindet. Unter diesen Reaktionsbedingungen sind die DNA-Bindungseigenschaften

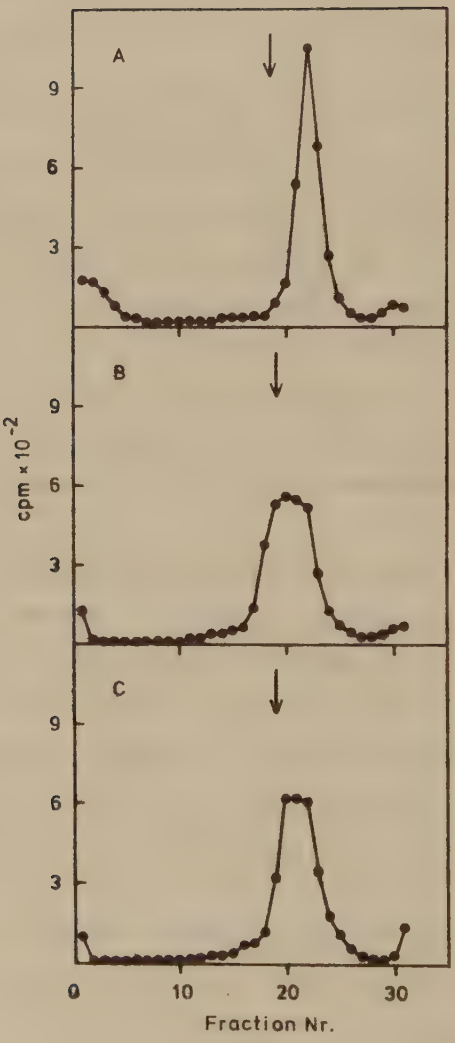

Abb. 15

Abb. 15: Nachweis von Komplexen aus recA Protein und zirkulärer PM2 DNA mit Einzelstrang-Lücken. 1,7 nMol PM2 [^{3}H] DNA (pro Molekül ca. 2,7 Strang-Lücken von 200 Nukleotiden Länge) wurden mit 26 µg recA Protein in 150 µl- Reaktionsansätzen 10 Minuten bei 37°C inkubiert und in neutralen Saccharosegradienten zentrifugiert (s. Legende zur Abb. 14). Der Pfeil markiert die Sedimentation von T7 [^{32}P] DNA in denselben Gradienten. Die Reaktionsansätze enthielten 10 mM $MgCl_2$ und unterschieden sich wie folgt:

A) ohne recA Protein

B) ohne Nukleosidtriphosphat

C) mit 1 mM GTP

bezüglich der Stabilität und Reversibilität vermutlich den Eigenschaften des Proteins in Gegenwart von ATP recht ähnlich und entsprechen damit wahrscheinlich eher in vivo -Bedingungen als die extrem feste Bindung des Proteins an einzelsträngige DNA in Gegenwart von ATP-γ-S oder nur Mg^{2+}. Auf der anderen Seite ist GTP jedoch kein Kofaktor zur Bildung von rekombinanten DNA-Strukturen in vitro (McEntee et al., 1979). West et al. (1980) zeigten, daß das recA Protein unter ähnlichen Reaktionsbedingungen wie in Abb. 15, aber mit ATP als Kofaktor, aus zirkulären, partiell einzelsträngigen DNA-Molekülen sehr komplexe Strukturen bildet, die aus hunderten von Molekülen bestehen, die über Wasserstoffbrücken-Bindungen miteinander verknüpft sind. Diese sehr schnell sedimentierenden Strukturen wurden in Gegenwart von GTP nicht beobachtet (Abb. 15 C). Die hier erarbeiteten Versuchsbedingungen waren demnach so, daß die Aktivitäten des recA Proteins hauptsächlich auf die DNA-Bindungsfähigkeit beschränkt waren.

4.2 Effekt des recA Proteins auf die exo- und endonukleolytische Aktivität des recBC Enzyms

Es wurde zunächst untersucht, ob die vom recBC Enzym katalysierte Degradierung von linearer Doppelstrang-DNA durch das recA Protein beeinflußt wird. Dies könnte theoretisch möglich sein, falls das recA Protein eine direkte inhibierende Wirkung auf die Aktivität des recBC Enzyms besäße (z.B. durch eine proteolytische Inaktivierung). Außerdem mußte in Betracht gezogen werden, daß das recA Protein möglicherweise an die Einzelstränge bindet, die vom recBC Enzym während der Degra-

dierung der doppelsträngigen DNA gebildet werden, und deren weiteren Abbau zu säurelöslichen Produkten inhibiert. Für diese Teste wurde ein so großer Überschuß an recA Protein verwendet, daß die gesamte DNA, falls sie in einzelsträngiger Form vorläge, mit dem Protein gesättigt wäre (16 µg Protein/ nMol DNA). Unter diesen Bedingungen wurde keinerlei inhibierende Wirkung des recA Proteins beobachtet. Die Produktion von säurelöslichem Material aus P22 [^{3}H] DNA wurde durch das recA Protein nicht-meßbar beeinflußt (Abb. 16). Auch die Menge der aus der P22 DNA freigesetzten nicht-säurelöslichen DNA-Fragmente und deren Größen-Verteilung in neutralen Saccharosegradienten blieb in Gegenwart von recA Protein unverändert.

Die exonukleolytische Degradierung von einzelsträngiger DNA durch das recBC Enzym wurde zu 35 % inhibiert, wenn das recA Protein im Überschuß zugesetzt wurde (Abb. 17). Für diesen Test wurden Fragmente von fd DNA verwendet, so daß keine komplementären Stränge vorlagen und somit auch in Gegenwart von recA Protein keine Renaturierung eintreten konnte. Mit recA Protein Konzentrationen, die geringer waren als zur Sättigung der gesamten DNA im Testansatz notwendig (z.B. mit 6 µg recA Protein/nMol DNA), wurde unter sonst gleichen Testbedingungen (wie in Abb. 17) die anfängliche Degradierungsrate nicht reduziert. Da das recA Protein an einzelsträngige DNA kooperativ bindet (West et al., 1980), ist vermutlich unter nicht-sättigenden Bedingungen ein Teil der DNA vollkommen frei von Protein und wird vom recBC Enzym bevorzugt abgebaut.

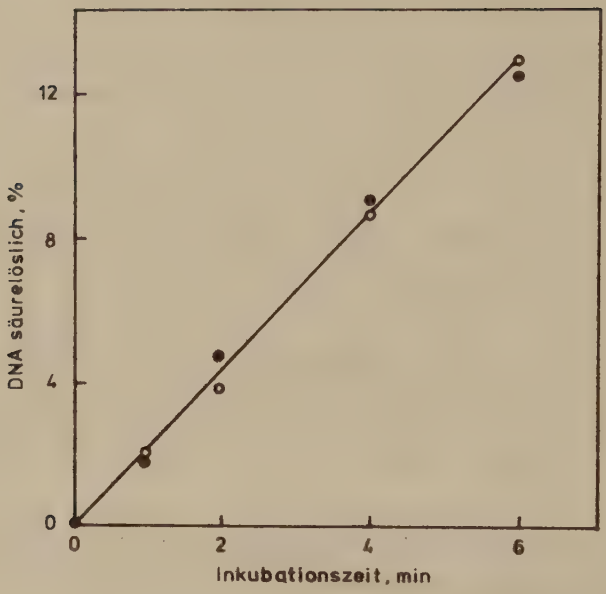

Abb. 16: Degradierung von linearer Doppelstrang-DNA durch das recBC Enzym in Gegenwart von recA Protein.

10 nMol P22[^{3}H]DNA wurden in 250 µl Standard-Reaktionsgemisch 10 Minuten bei 37°C mit 160 µg recA Protein (o) bzw. ohne recA Protein (●) inkubiert. Danach wurden 5 Einheiten recBC Enzym zugesetzt. Nach den angegebenen Zeiten wurden 50 µl- Proben zur Bestimmung der säurelöslichen Degradierungsprodukte entnommen.

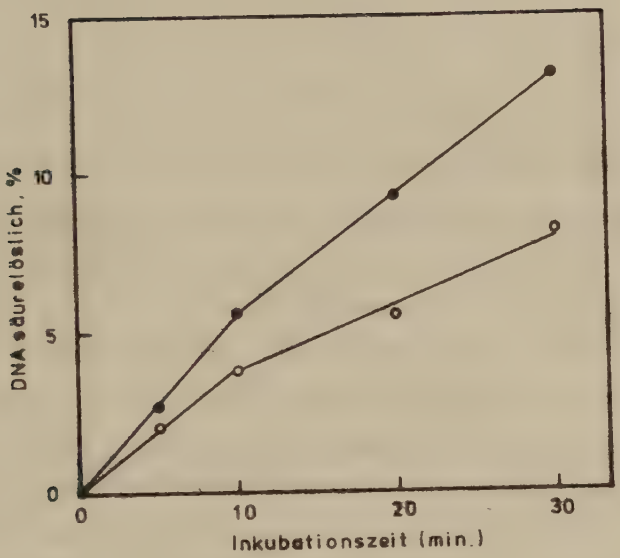

Abb. 17: Degradierung von linearer Einzelstrang-DNA durch das recBC Enzym in Gegenwart von recA Protein.

1,75 nMol DNA-Fragmente aus fd[^{3}H]DNA (Molekulargewicht der Fragmente = 6,6 x 10^{5}; zur Präparation s. Absch. III 5.3) wurden in 300 µl Standard-Reaktionsgemisch 10 Minuten bei 37°C mit 30 µg recA Protein (o) bzw. ohne recA Protein (●) inkubiert. Danach wurden 2 Einheiten recBC Enzym zugegeben. Nach den angegebenen Zeiten wurden 60 µl- Proben zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte entnommen.

Schließlich wurde ein möglicher Einfluß des recA Proteins auf die endonukleolytische Spaltung einzelsträngiger DNA überprüft. Mit zirkulärer fd DNA als Substrat zeigte sich, daß der Abbau durch kombinierte Einwirkung der Endo- und Exonuklease Aktivität des recBC Enzyms in Gegenwart von recA Protein wesentlich stärker inhibiert wurde als der Abbau linearer Fragmente der fd DNA (Abb. 18). Dies ließ bereits vermuten, daß auch die endonukleolytische Aktivität des recBC Enzyms teilweise inhibiert wurde. Genauere Untersuchungen zur Inhibition der Endonuklease Aktivität wurden mit einem empfindlicheren Test durchgeführt, der bereits in Absch. 3.1 beschrieben wurde und in einer Sedimentationsanalyse der Spaltprodukte aus einzelsträngiger zirkulärer DNA besteht. Dazu wurde fd DNA in alkalischen Saccharosegradienten zentrifugiert, um die Anteile linearer und fragmentierter Moleküle zu ermitteln. Zusätzlich wurden die säurelöslichen Produkte gemessen. Die Experimente wurden mit verschiedenen Mengen recBC Enzym (2 bis 13 Einheiten/nMol DNA) und verschiedenen Inkubationszeiten (8 bis 30 Minuten) durchgeführt. In allen Experimenten war die Gesamtmenge der fragmentierten DNA-Moleküle in Abwesenheit von recA Protein etwa 2-fach höher als in Gegenwart von recA Protein, das in Konzentrationen von mindestens 15 µg/nMol DNA eingesetzt wurde. Lineare DNA-Moleküle von unverminderter Länge wurden in keinem der Experimente identifiziert. Aus diesem Grunde konnte die DNA nach Enzym-Behandlung auch durch Sedimentation in neutraler Saccharose analysiert werden (normalerweise wird einzelsträngige DNA zur Vermeidung von Sedimentationsartefakten in alkalischer

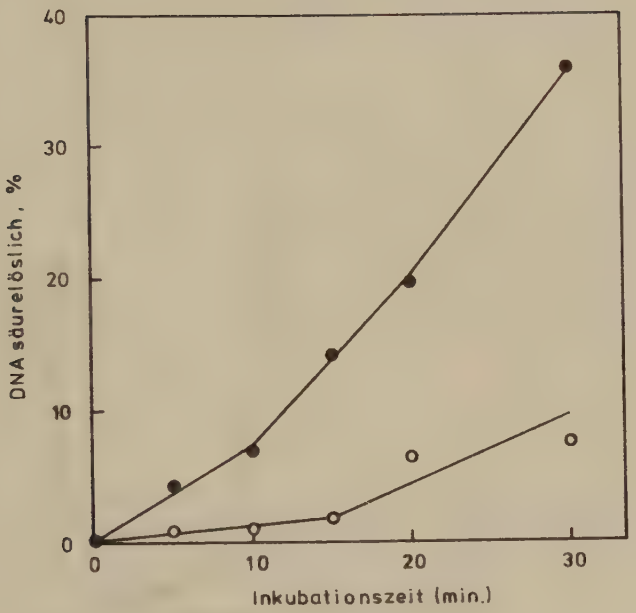

Abb. 18: Degradierung von zirkulärer Einzelstrang-DNA durch das recBC Enzym in Gegenwart von recA Protein.

6,9 nMol fd[^{3}H]DNA wurden mit 120 µg recA Protein (o) bzw. ohne recA Protein (●) in 0,6 ml Standard-Reaktionsgemisch 10 Minuten bei 37^{o}C inkubiert. Danach wurden 12 Einheiten recBC Enzym zugesetzt und nach den angegebenen Zeiten 0,1 ml- Proben zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte entnommen.

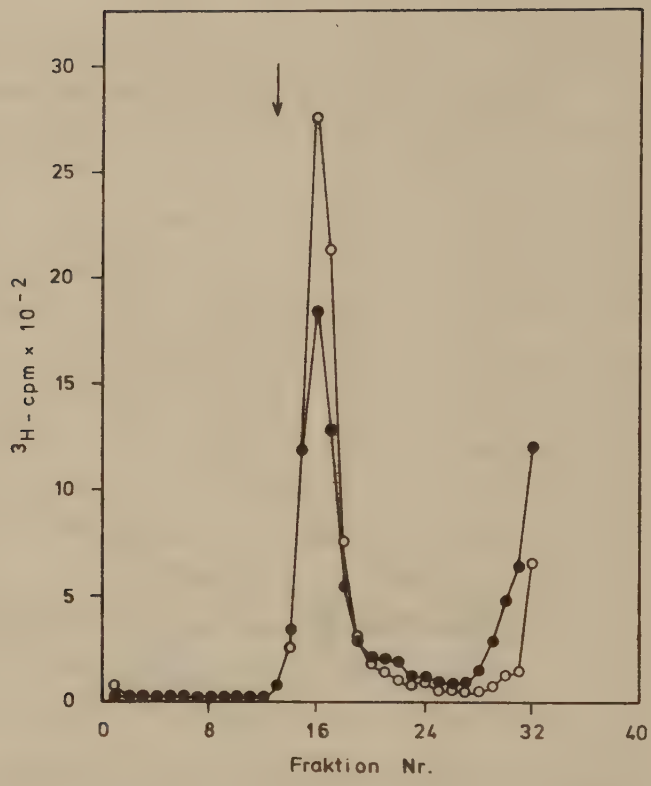

Abb. 19: Sedimentation von fd DNA in neutralen Saccharosegradienten nach Degradierung mit dem recBC Enzym in Gegenwart und Abwesenheit von recA Protein.

1,7 nMol fd[^{3}H]DNA wurden mit 60 µg recA Protein (o) bzw. ohne recA Protein (●) in 150 µl Standard-Reaktionsgemisch 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 22 Einheiten recBC Enzym zugesetzt. Nach 8 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe eines Überschusses an EDTA und 0,1 % SDS beendet. Den Ansätzen wurden 60 µl zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte entnommen. Der Rest der Ansätze wurde in neutralen Saccharosegradienten 3 Stunden bei 50000 Upm im SW60 TI Rotor zentrifugiert. Der Pfeil markiert die Position von λ ^{32}P DNA.

Saccharose zentrifugiert). Zirkuläre und lineare fd DNA sedimentiert in neutraler Saccharose etwa gleich schnell, dafür wird aber die intakte zirkuläre DNA von den gebildeten Fragmenten besser abgetrennt. Ein typisches Ergebnis zeigt Abb. 19. Nach Inkubation der fd DNA mit 13 Einheiten recBC Enzym pro nMol DNA waren in Abwesenheit von recA Protein nach 8 Minuten 37 % der DNA degradiert (Fraktion 20-32), 21 % der DNA waren säurelöslich. In Gegenwart von recA Protein (35 µg/nMol DNA) wurden insgesamt 15,4 % der DNA degradiert und nur 6,3 % waren zu säurelöslichen Produkten degradiert worden. Demnach wird die endonukleolytische Spaltung einzelsträngiger DNA durch das recBC Enzym um 50 % inhibiert, wenn die DNA mit recA Protein komplexiert ist.

Zusammenfassend zeigten die Versuche, daß die endo- und exonukleolytische Degradierung von einzelsträngiger DNA durch das recBC Enzym in Gegenwart von DNA-sättigenden Konzentrationen des recA Proteins teilweise inhibiert ist. Selbst mit sehr hohen recA Protein Konzentrationen war eine vollständige Inhibition der Degradierung von einzelsträngiger DNA nicht möglich; die hemmende Wirkung des recA Proteins ist deshalb als schwach zu bezeichnen. Die exonukleolytische Aktivität des recBC Enzyms mit linearer Doppelstrang-DNA wurde durch das recA Protein nicht beeinflußt.

4.3 Effekt des recA Proteins auf die Degradierung von zirkulärer DNA mit Einzelstrang-Lücken durch das recBC Enzym

Die Experimente wurden mit demselben PM2 DNA-Substrat durchgeführt, das auch für die Untersuchungen zur Bindung des recA

Proteins an Einzelstrang-Lücken verwendet wurde (Abb. 15). Das recA Protein wurde für diese Teste in deutlich höheren Konzentrationen eingesetzt als zur Sättigung der einzelsträngigen Regionen in der DNA notwendig gewesen wäre, und wurde in Abwesenheit des recBC Enzyms mit der DNA vorinkubiert. Das recBC Enzym wurde nach 10 Minuten zugegeben. In allen Experimenten wurde gefunden, daß die vom recBC Enzym aus der DNA freigesetzten Degradierungsprodukte in Anwesenheit und Abwesenheit von recA Protein weitgehend identisch waren. Ein typisches Ergebnis zeigt Abb. 20. In beiden Reaktionsansätzen wurden 9 % säurelösliche Produkte gemessen. Eine Analyse der Reaktionsprodukte durch Zentrifugation in neutraler Saccharose ließ ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erkennen: 75 % der DNA sedimentierten noch immer mit 21,5 S und waren daher noch zirkulär. Die restliche DNA bestand aus Fragmenten, deren Größenverteilung durch das recA Protein nicht wesentlich beeinflußt wurde. Entsprechende Ergebnisse wurden auch mit einem PM2 DNA-Substrat erzielt, das nur eine Einzelstrang-Lücke von 200 Nukleotiden Länge enthielt.

Die Ergebnisse zeigten, daß Einzelstrang-Lücken in der PM2 DNA in Gegenwart von recA Protein vor dem recBC Enzym ungeschützt blieben. Dies ist überraschend, weil das recA Protein unter denselben Testbedingungen an einzelsträngige DNA bindet (Abb. 14, 15). Außerdem wurde die endonukleolytische Aktivität des recBC Enzyms in Gegenwart von recA Protein um 50 % inhibiert. Die Beobachtung, daß die Degradierung der PM2 DNA nicht einmal geringfügig durch das recA Protein inhibiert wurde, fordert daher eine Erklärung.

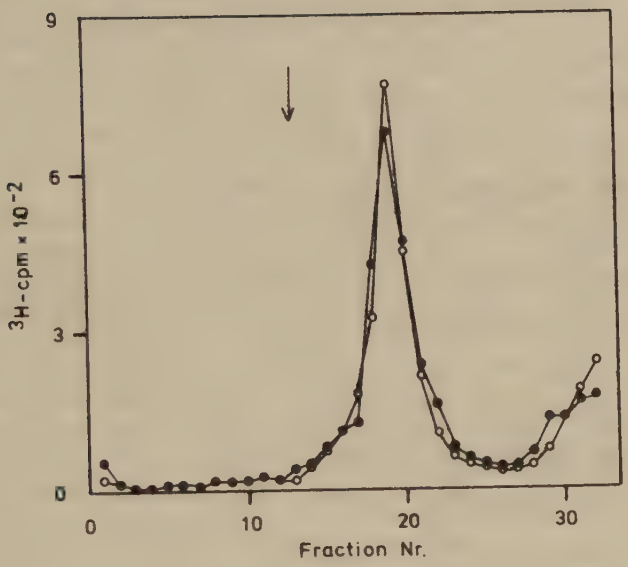

Abb. 20: Sedimentation von PM2 DNA in neutralen Saccharosegradienten nach Degradierung mit dem recBC Enzym in Gegenwart und Abwesenheit von recA Protein.

2,6 nMol ^{3}H-markierte PM2 DNA (mit Einzelstrang-Lücken wie in Abb. 15)wurden mit 40 µg recA Protein (O) bzw. ohne recA Protein (●) in 150 µl Standard-Reaktionsgemisch 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Es wurden 4,4 Einheiten recBC Enzym zugesetzt und weitere 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe eines Überschusses an EDTA und 0,1 % SDS wurden 60 µl- Proben zur Bestimmung der säurelöslichen Produkte entnommen. Der Rest der Ansätze wurde in neutralen Saccharosegradienten 3 Stunden bei 50000 Upm im SW60 TI Rotor zentrifugiert. Der Pfeil markiert die Position von λ ^{32}P DNA in denselben Gradienten.

Eine Deutung könnte sein, daß an den Einzelstrang-Lücken wesentlich weniger recA Protein gebunden wurde als an gleich lange Abschnitte der einzelsträngigen fd DNA. Da aber das Sedimentationsverhalten der PM2 DNA in neutraler Saccharose durch das gebundene recA Protein meßbar verändert wurde (Abb. 15), obwohl das DNA-Präparat insgesamt nur 6 % einzelsträngige DNA enthielt, ist diese Erklärung wahrscheinlich nicht zutreffend. Wahrscheinlicher ist, daß die Einzelstrang-Lücken mit recA Protein besetzt waren, und trotzdem für das recBC Enzym ein ebenso gutes Substrat bildeten wie Protein-freie Einzelstrang-Lücken. Zirkuläre Doppelstrang-DNA mit Lücken wird vom recBC Enzym bevorzugt an den Übergängen von einzel- und doppelsträngiger DNA endonukleolytisch angegriffen (Absch. 2 und 3). Es ist denkbar, daß speziell diese Regionen der Einzelstrang-Lücken durch das gebundene recA Protein nicht geschützt werden, sondern für das recBC Enzym erkennbar bleiben. Dann wäre eine Inhibition der Degradierung dieses DNA-Substrats nicht zu erwarten, denn auch der weitere Abbau des doppelsträngigen DNA-Anteils wird durch das recA Protein nicht beeinflußt (Absch. 4.2).

V. DISKUSSION

1. Die Reaktion von gereinigtem recBC Enzym mit einzelsträngigen Regionen in doppelsträngiger DNA

Hinsichtlich der Funktion des recBC Enzyms bei der genetischen Rekombination und der rekombinativen DNA-Reparatur ist eine interessante Frage, wie das Enzym an Einzelstrang-Lücken in doppelsträngiger zirkulärer DNA wirkt. Einzelstrang-Lücken könnten für zwei der enzymatischen Aktivitäten des recBC Enzyms gleichermaßen ein Substrat bilden, nämlich für die Endonuklease-Aktivität und die DNA-Entwindeaktivität. Deshalb stehen für den Verlauf des Abbaues von zirkulärer doppelsträngiger DNA mindestens zwei Möglichkeiten zur Diskussion. Die erste bestände in einer endonukleolytischen Spaltung des Einzelstranges. Die Bedeutung einer solchen Reaktion an Strang-Lücken, die zu linearen Intermediaten führt, wäre jedoch nicht leicht zu erklären. Ein Reparatursystem für Doppelstrangbrüche steht in vivo nicht zur Verfügung, weshalb ein einmal "zerbrochenes" Chromosom nicht mehr zu reparieren ist (Bonura et al., 1975); es würde letztlich vollständig abgebaut, u.a. auch vom recBC Enzym selbst. Besäße das recBC Enzym dagegen die Fähigkeit, eine Einzelstrang-Lücke als Startpunkt für die Entwindung der DNA zu nutzen, ohne die DNA zuvor endonukleolytisch zu spalten, so wäre dies eine Aktivität, die in vivo zu biologisch "sinnvollen" Reaktionen führen könnte. Die Reaktion an den Strang-Lücken könnte dann beispielsweise so verlaufen, daß einzelsträngige Regionen vergrößert werden, daß Einzelstrangenden durch Entwindung freigesetzt werden, oder daß im Verlauf der Entwindung gelegentlich Einzelstrangbrüche

eingeführt werden, wozu das Enzym in Gegenwart von Ca^{2+} befähigt ist (Rosamond et al., 1979; hierbei handelt es sich um Strangbrüche, die durch DNA-Ligase reparierbar sind; s.Absch. IV.3.1). Dies alles wären strukturelle Veränderungen der DNA, die nach gegenwärtigen Vorstellungen für den Ablauf von Rekombinationsprozessen von Bedeutung sind (s. Radding, 1978).

Die Versuchsergebnisse mit dem gereinigten recBC Enzym in vitro deuten jedoch eher darauf hin, daß die Degradierung der zirkulären DNA über lineare Zwischenprodukte verläuft; so wird z.B. lineare Doppelstrang-DNA und zirkuläre Doppelstrang-DNA mit Lücken zu Produkten ähnlicher Art und mengenmäßiger Zusammensetzung abgebaut (Absch. IV.2.1). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die zirkuläre DNA zuerst in ein lineares Molekül umgewandelt wird und danach von den Enden her degradiert wird. Das recBC Enzym scheint jedoch für den endonukleolytischen Schnitt einen bestimmten Bereich der einzelsträngigen Region zu bevorzugen, nämlich den Bereich des Überganges von einzel- und doppelsträngiger DNA. Die Beobachtungen, die zu dieser Annahme führten, wurden in Absch. IV.2 diskutiert. Das recBC Enzym besitzt demnach eine besondere Affinität zu dem Bereich der Strang-Lücken, von dem aus die Entwindung eines zirkulären DNA-Moleküls eingeleitet würde. Diese Eigenschaft des Enzyms ließ vermuten, daß eine Entwindung von zirkulärer DNA grundsätzlich auch ohne eine vorausgehende endonukleolytische Spaltung möglich wäre. Die Verwendung bestimmter Versuchsbedingungen schien geeignet zu sein,diese Annahme zu überprüfen. In Gegenwart von Ca^{2+} entfaltet das recBC Enzym hauptsächlich seine DNA-Entwindeaktivität. Es besitzt dann keine meßbare

Endonuklease-Aktivität mit einzelsträngiger DNA und eine so schwache nukleolytische Aktivität mit doppelsträngiger DNA, daß während der DNA-Entwindung lediglich eine geringe Anzahl von Einzelstrangbrüchen in die DNA eingeführt wird (Absch. IV.3.1; Rosamond et al., 1979). Es wurde erwartet, daß die DNA in Gegenwart von Ca^{2+} von dem recBC Enzym nach dem typischen Mechanismus vorübergehend entwunden wird (s. Abb. 1), aber wegen der Inhibition der endonukleolytischen Aktivität für einzelsträngige DNA dabei zirkulär bliebe. Entgegen dieser Annahme zeigte sich jedoch, daß der überwiegende Teil derjenigen DNA-Moleküle, die vom recBC Enzym entwunden worden waren, danach nicht mehr in der zirkulären Form vorlag. Im Gegensatz dazu wurden lineare Doppelstrang-Moleküle in Gegenwart von Ca^{2+} von dem recBC Enzym nicht "zerbrochen". Es ist deshalb anzunehmen, daß die zirkuläre DNA innerhalb der einzelsträngigen Regionen endonukleolytisch gespalten wurde, obwohl unter den gleichen Testbedingungen keine endonukleolytische Aktivität mit vollständig einzelsträngiger DNA meßbar war. Diese widersprüchliche Beobachtung mag so zu erklären sein, daß die Einzelstrang-Lücken aufgrund ihrer spezifischen Struktur - Lücken werden von Übergängen in Doppelstrangbereiche begrenzt - für die Endonuklease-Aktivität des Enzyms ein besseres Substrat bildeten als die vollständig einzelsträngige DNA (Absch. IV.2.2-2.3). Wenn also am Übergang in den Doppelstrangbereich ein endonukleolytischer Schnitt erfolgt, dann würde die anschließende Entwindung von einem Doppelstrangende aus beginnen. Andererseits könnte auch die schwache endonukleolytische Aktivität mit doppelsträngiger

DNA in Gegenwart von Ca^{2+} verantwortlich dafür sein, daß die DNA-Moleküle schließlich nicht zirkulär blieben. Entsprechend dieser Vorstellung würde die zunächst noch zirkuläre DNA von den Strang-Lücken ausgehend entwunden und dabei häufig so frühzeitig nach Eindringen in den Doppelstrangbereich gespalten, daß lineare Moleküle entstehen. (Diese Reaktion würde mit linearer Doppelstrang-DNA als Ausgangs-Substrat nicht erkennbar sein.) Die DNA-Entwindungsreaktion würde in diesem Fall also an zirkulären Molekülen eingeleitet. Die anfänglich gestellte Frage, ob das recBC Enzym die Fähigkeit besitzt, eine Reaktion mit einem zirkulären DNA-Molekül durchzuführen, ohne es in ein lineares Molekül umzuwandeln, bleibt also vorerst ungeklärt.

Unter in vitro- Bedingungen scheint also eine Umwandlung der zirkulären DNA-Moleküle in lineare Fragmente unumgänglich zu sein. Geeignete Testbedingungen, die derart regulierend auf das recBC Enzym einwirken, daß diese Reaktion vermieden wird, wurden bisher nicht gefunden. Auch die Testbedingungen in Gegenwart von Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Ionen erfüllen diese Anforderung nicht. Dies sollte jedoch nicht zu der Annahme führen, daß das recBC Enzym auch in vivo auf diese Weise mit einzelsträngigen Regionen in der chromosomalen DNA reagiert, was ja zu einer für die Zelle letalen DNA-Struktur führen würde (s.o.). Unter in vivo- Bedingungen sind vielfältige Einflüsse auf die Wirkung des recBC Enzyms durch Mitwirkung anderer Enzyme oder Proteine und durch die spezifische Zusammensetzung des intrazellulären Millieus denkbar, wodurch bestimmte Reaktionen an Strang-Lücken, z.B. endonukleolytische Spaltung oder Entwin-

dung, modifiziert oder auch verhindert werden könnten. Bereits die Veränderung der *in vitro*- Eigenschaften des *recBC* Enzyms durch Kalium- und Calcium-Ionen (Hermanns und Wackernagel, 1977; Rosamond et al., 1979), durch die ATP-Konzentration (Karu et al., 1973) und die Komplexbildung mit DNA-Polymerasen von *E. coli* (Hendler et al., 1975) verdeutlichen verschiedene Möglichkeiten der Regulation dieses Enzyms. Denkbar wäre auch, daß *in vivo* ein Protein existiert, welches eine dritte Untereinheit des *recBC* Enzyms bildet und dadurch seine Eigenschaften modifiziert. Während der Reinigung ginge diese hypothetische Untereinheit verloren. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß nur eine der beiden bekannten Untereinheiten des *recBC* Enzyms von den Genen *recB* und *recC* determiniert wird (Liebermann und Oishi, 1974). Das Strukturgen für diese Untereinheit (β) ist wahrscheinlich das Gen *recB*; das vom Gen *recC* determinierte Protein bildet entweder eine strukturelle Komponente dieser Untereinheit oder es ist erforderlich für die Bildung von aktivem *recBC* Enzym aus einer Enzymvorstufe (Tomizawa und Ogawa, 1972). Die genetische Herkunft der zweiten Untereinheit (α) konnte bisher nicht identifiziert werden.

2. Die Bedeutung des recA Proteins für die Regulation der DNA-Degradierung nach UV-Bestrahlung der Zelle

Das recA Protein ist neben dem lexA Protein das wichtigste Enzym für die Regulation der DNA-Degradierung nach UV-Bestrahlung der Zelle (s. Witkin, 1976). Da die Funktionen und Eigenschaften des recA Proteins vielfältig sind, sind grundsätzlich auch mehrere Möglichkeiten denkbar, wie das recA Protein auf den Abbau der beschädigten chromosomalen DNA regulierend einwirken könnte (s. Absch. I). Einzelstrang-Lücken sind vermutlich diejenigen DNA-Schäden, an denen in Abwesenheit von aktivem recA Protein ein unkontrollierter DNA-Abbau durch zelluläre DNasen stattfindet (Einzelstrang-Lücken treten nach UV-Bestrahlung als "postreplikative sekundäre" DNA-Schäden auf; Rupp et al., 1971).

Eine Hypothese wäre, daß einzelsträngige DNA-Regionen durch eine Besetzung mit Protein vor den zellulären DNasen, insbesondere vor der recBC DNase, geschützt werden. Für einen solchen Schutzmechanismus gibt das Einzelstrang- spezifische DNA-Bindeprotein von E. coli ein Beispiel: es wurde in vitro gezeigt, daß einzelsträngige DNA in Gegenwart des DNA-Bindeproteins gegenüber dem recBC Enzym vollkommen resistent ist (McKay und Linn, 1976). Dies erfordert allerdings stöchiometrische Mengen des Proteins. Falls tatsächlich DNA-Bindeproteine in vivo wesentlich zur Stabilisierung der DNA beitragen, wird eine Unterstützung durch weitere DNA-Bindeproteine möglicherweise erforderlich, wenn nach UV-Bestrahlung wesentlich größere Bereiche der DNA in einzelsträngiger Form vorliegen als unter normalen Bedingungen. Das DNA-Bindeprotein

übt normalerweise seine Hauptfunktion an den Einzelstrang-bereichen der Replikationsgabel aus, und seine intrazelluläre Konzentration beträgt ca. 800 Moleküle pro Zelle (s. Kornberg, 1974). Das recA Protein selbst besitzt u.a. auch die Eigenschaft, Komplexe mit einzelsträngiger DNA zu bilden; hinzu kommt, daß die Syntheserate des recA Proteins durch die auftretenden DNA-Schäden reguliert wird (Gudas und Mount, 1977; s. Abb. 2). Nach UV-Bestrahlung der Zelle liegt das recA Protein in Konzentrationen vor, die ausreichend wären, eine einzelsträngige DNA-Region von ein Zehntel der Länge des Chromosoms vollständig mit dem Protein zu besetzen (ca. 80000 Monomere pro Zelle; Gudas und Pardee, 1975, 1976).

Die in dieser Arbeit beschriebenen in vitro- Untersuchungen mit gereinigtem recA Protein zeigten jedoch, daß einzelsträngige DNA, die mit dem recA Protein besetzt ist, gegenüber dem recBC Enzym nicht sehr resistent ist (Absch. IV.4.2). Sowohl der exonukleolytische- als auch der endonukleolytische Abbau von einzelsträngiger DNA wird durch das gebundene recA Protein nur zum Teil inhibiert (zu 35 bzw. 50 %). Das in diesem Zusammenhang wichtigste DNA-Substrat war zirkuläre Doppelstrang-DNA mit einzelsträngigen Regionen. Es wurde gezeigt, daß das recA Protein an die einzelsträngigen Regionen bindet (Abb. 15). Trotzdem besitzt das recA Protein nicht die Fähigkeit, den Abbau dieses DNA-Substrats durch das recBC Enzym auch nur teilweise zu inhibieren (Absch. IV.4.3). Das bedeutet, daß die endonukleolytische Aktivität des recBC Enzyms an Einzelstrang-Lücken durch das gebundene recA Protein nicht beeinflußt wird. Wie bereits in Absch. IV.4.3 angedeutet wurde, ist anzunehmen,

daß besonders der vom recBC Enzym für die endonukleolytische Spaltung bevorzugte Bereich des Überganges von einzel- und doppelsträngiger DNA durch das recA Protein nicht geschützt wird. Dagegen werden Einzelstrang-Lücken durch das DNA-Bindeprotein von E. coli vor dem recBC Enzym vollständig geschützt (McKay und Linn, 1976). Aus diesen Beobachtungen ist zu schließen, daß die DNA-Bindungseigenschaften des recA Proteins sich von denen des DNA-Bindeproteins wesentlich unterscheiden. Sie sind offensichtlich nicht geeignet, um einzelsträngigen DNA-Regionen einen hinreichenden Schutz vor dem recBC Enzym zu gewähren. Es wurde nicht untersucht, ob andere DNasen von E. coli durch das recA Protein stärker inhibiert werden. Unter dem Aspekt, daß der UV-induzierte DNA-Abbau jedoch zum größten Teil auf das recBC Enzym zurückzuführen ist und in seinem Ausmaß vom Gen recA reguliert wird (s. Absch. I), kann angenommen werden, daß die DNA-Bindung des recA Proteins allein nicht diejenige Funktion ist, die wesentlich zur Regulation der DNA-Degradierung beiträgt.

Eine weitere Möglichkeit, die DNA-Degradierung an den Strang-Lücken einzuschränken, könnte auf einer besonders wirksamen Reparatur beruhen, die Lücken schließt, ehe an ihnen extensive DNA-Degradierung begonnen wird. Bei Einzelstrang-Lücken, die nach UV-Bestrahlung auftreten, handelt es sich um "postreplikative" Lücken gegenüber Pyrimidin-Dimeren, die bei Neu-Beginn der DNA-Replikation noch nicht durch Excisions-Reparatur entfernt wurden. Diese Strang-Lücken werden hauptsächlich durch einen Rekombinationsprozess zwischen den beiden Tochter-Chromosomen geschlossen (s. Lehmann und Bridges, 1977). Das

recA Protein ist ein besonders wichtiger Bestandteil dieses rekombinativen Reparatur-Systems; in recA Mutanten ist eine Reparatur dieser DNA-Schäden nicht möglich. Es wurde beobachtet, daß die Reparatur der genannten Strang-Lücken nach Induktion der "SOS-Funktionen" in $recA^+$ $lexA^+$ Zellen wesentlich effektiver verläuft als in nicht-induzierten Zellen (s. Witkin, 1976; Lehmann und Bridges, 1977). Diese Erhöhung der Reparatur-Kapazität der Zellen mag auf mindestens zwei $recA^+$ $lexA^+$- abhängige Vorgänge zurückzuführen sein. Erstens wird für die Reparatur einer kleinen Fraktion von "postreplikativen" UV-Schäden ein mutagen wirkendes Reparatur-System induziert, auf das bereits in Absch. I hingewiesen wurde. Zweitens wird die Syntheserate des recA Proteins drastisch erhöht. Es ist vorstellbar, daß diese hohen recA Protein-Konzentrationen eine besonders wirksame rekombinative DNA-Reparatur gewährleisten. Für diese Annahme spricht, daß auch in vitro zur Bildung von rekombinanten DNA-Molekülen das recA Protein in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis zur DNA vorliegen muß (McEntee et al., 1979; Shibata et al., 1979 b). Das recA Protein trägt also auf zweifache Weise dazu bei, daß die Nuklease- sensiblen "postreplikativen " Strang-Lücken rasch repariert werden. Da das recA Protein offensichtlich nicht die Eigenschaften eines "Schutzproteins" für Einzelstrang-Lücken besitzt und bisher auch noch keine direkten Hinweise auf die Existenz eines anderen UV-induzierbaren "Inhibitors" für das recBC Enzym gefunden wurden (Prell, 1977), ergibt sich folglich die Anschauung, daß die auf UV-Bestrahlung folgende DNA-Degradierung hauptsächlich durch die effektive DNA-Reparatur limitiert wird.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das recBC Enzym von E. coli ist eine ATP-abhängige DNase mit Funktionen bei der genetischen Rekombination und der DNA-Reparatur; es ist außerdem an dem Abbau der chromosomalen DNA nach UV-Bestrahlung der Zelle beteiligt. In vitro degradiert das recBC Enzym einzelsträngige DNA sowohl endo- als auch exonukleolytisch und doppelsträngige DNA exonukleolytisch nach einem prozessiven Mechanismus, der DNA-Entwindung einschließt.

Die Degradierung von strukturell unterschiedlichen DNA-Substraten durch das recBC Enzym wurde in vitro untersucht. Es handelte sich um lineare doppelsträngige DNA, doppelsträngige DNA mit einzelsträngigen Enden unterschiedlicher Länge und Polarität und zirkuläre DNA mit Einzelstrang-Lücken verschiedener Länge. Es wurde gefunden, daß das Enzym in Gegenwart von ATP und Abwesenheit von Mg^{2+} an doppelsträngige DNA bindet, ohne daß gleichzeitig DNA-Degradierung erfolgt. Eine vollständige Besetzung aller DNA-Enden mit Enzym erfordert die Anwesenheit eines 15 bis 20-fachen molaren Überschusses an Enzymmolekülen. Bei der prozessiven Degradierung von doppelsträngiger DNA zu säurelöslichen und -unlöslichen Produkten bewegt sich das Enzym entlang der DNA mit einer mittleren Geschwindigkeit von 950 Nukleotidpaaren pro Sekunde bei $37^{o}C$. Es wurde gezeigt, daß doppelsträngige DNA mit einzelsträngigen 3' oder 5' Enden vom recBC Enzym mit wesentlich niedrigerer Rate zu niedermolekularen Produkten abgebaut wird als native doppelsträngige DNA. Bei einzelsträngigen Enden von 100 Nukleotiden Länge und mehr beträgt die Degradierungsrate nur noch

1/10 der Rate mit nativer DNA. Zirkuläre Doppelstrang-DNA mit einzelsträngigen Regionen zwischen 13 und 650 Nukleotiden Länge wird ebenfalls mit 10-fach niedrigerer Rate degradiert als lineare Fragmente derselben DNA. Die DNA-Abbauprodukte gleichen denen, die auch aus linearer Doppelstrang-DNA gebildet werden (1/3 säurelösliche Oligonukleotide und 2/3 DNA-Fragmente). Es zeigte sich, daß Einzelstrang-Lücken in doppelsträngiger DNA unter Testbedingungen, die inhibierend auf die Einzelstrang- spezifische Endo- und Exonuklease-Aktivität wirken, dennoch ein Substrat für das recBC Enzym bilden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß Einzelstrang-Lücken in doppelsträngiger DNA vom recBC Enzym nicht in zufälligen Positionen endonukleolytisch gespalten werden, sondern bevorzugt in der Nähe des Überganges vom einzelsträngigen zum doppelsträngigen Bereich.

Das recA Protein ist ein multifunktionales Enzym, das in E. coli eine Schlüsselfunktion bei der genetischen Rekombination und der Regulation von zellulären Antworten auf UV-Beschädigung der DNA ausübt. Hinsichtlich der Regulation des UV-induzierten DNA-Abbaues wurde der Einfluß von gereinigtem recA Protein auf die verschiedenen nukleolytischen Aktivitäten des recBC Enzyms untersucht. Die verwendeten Testbedingungen erlaubten die Bindung von recA Protein an einzelsträngige DNA, jedoch keine Bildung von rekombinanten DNA-Molekülen. Die exonukleolytische Degradierung von doppelsträngiger DNA wurde durch das recA Protein nicht beeinflußt. Mit DNA-sättigenden Konzentrationen des recA Proteins wurde eine 50 %ige Inhibition der Endonuklease-Aktivität und eine 35 %ige Inhibition

der Exonuklease-Aktivität mit einzelsträngiger DNA beobachtet. Dagegen wurden Einzelstrang-Lücken in doppelsträngiger zirkulärer DNA durch das recA Protein nicht geschützt. Aus diesem Befund ist zu schließen, daß das recA Protein nicht als "Schutzprotein" für Nuklease- sensible einzelsträngige Regionen in der beschädigten chromosomalen DNA wirkt. Alternative Möglichkeiten, wie das recA Protein dennoch regulierend auf den durch UV-Bestrahlung ausgelösten DNA-Abbau wirken kann, werden diskutiert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Alberts, B. & Herrick, G. (1971)
DNA-Cellulose Chromatography.
Methods Enzymol. 21, 198-217

Baluch, J., Sussman, R. & Resnick, J. (1980)
Induction of prophage λ without amplification of recA protein.
Molec. Gen. Genet. 178, 317-323

Barbour, S.D. & Clark, A.J. (1970)
Biochemical and genetic studies of recombination proficiency in Escherichia coli. I. Enzymatic activity associated with $recB^+$ and $recC^+$ genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 65, 955-961

Benbow, R.M., Zuccarelli, A.J. & Sinsheimer, R.L. (1974)
A role for single-strand breaks in bacteriophage ØX174 genetic recombination.
J. Mol. Biol. 88, 629-651

Bergmann, R. (1975)
Veränderungen der Ribosomen bei der Sporulation von Bacillus subtilis.
Diss. Ruhr-Universität (Bochum)

Berkowitz, S.A. & Day, L.A. (1976)
Mass, length, composition and structure of the filamentous virus fd.
J. Mol. Biol. 102, 531-548

Bonura, T., Town, C.D., Smith, K.C. & Kaplan, H.S. (1975)
The influence of oxygen on the yield of DNA double-strand breaks in X-irradiated E. coli K-12.
Radiat. Res. 63, 567-577

Bøvre, K. & Szybalski, W. (1971)
Multistep DNA-RNA hybridisation techniques.
in Meth. in Enzymol. Vol. XXI part D, pp. 350-385
eds. L. Grossman & K. Moldawe
Academic Press, New York & London

Burgi, E. & Hershey, A.D. (1963)
Sedimentation rate as a measure of molecular weight.
Biophys. J. 3, 309-321

Buttin, G. & Wright, M. (1968)
Enzymatic DNA degradation in E. coli: its relationship to synthetic processes at the chromosome level.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 259-269

Capaldo-Kimball, F. & Barbour, S.D. (1971)
Involvement of recombination genes in growth and viability of Escherichia coli K-12.
J. Bacteriol. 106, 204-212

Carter, D.M. & Radding, C.M (1971)
The role of exonuclease and β protein of phage λ in genetic recombination. II. Substrate specificity and the mode of action of λ exonuclease.
J. Biol. Chem. 246, 2502-2512

Clark, A.J., Chamberlin, M., Boyce, R.P. & Howard-Flanders, P. (1966)
Abnormal metabolic response to ultraviolet light of a recombination-deficient mutant of Escherichia coli K-12.
J. Mol. Biol. 19, 442-454

Clark, A.J. (1973)
Recombination deficient mutants of E. coli and other bacteria.
Ann. Rev. Genet. 7, 67-86

Cooper, P.K. & Hanawalt, P.C. (1972)
Role of DNA polymerase I and the rec system in excision repair in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 1156-1160

Cunningham, R.P., Shibata, T., DasGupta, C. & Radding, C.M. (1979)
Single strands induce recA protein to unwind duplex DNA for homologous pairing.
Nature 281, 191-195

Davidson, N. & Szybalski, W. (1971)
Physical and chemical characterisation of lambda DNA.
in "The bacteriophage λ ", pp. 45-82
ed. A.D. Hershey, Cold Spring Harbor Laboratory

Dreiseikelmann, B. & Wackernagel, W. (1978)
The terminal redundant regions of bacteriophage T7 DNA: Their necessity for phage production studied by the infectivity of T7 DNA after modification by various exonucleases.
Mol. Gen. Genet. 159, 321-328

Emmerson, P.T. & West, S.C. (1977)
Identification of protein X of Escherichia coli as the recA$^+$/tif$^+$ gene product.
Mol. Gen. Genet. 155, 77-85

Espejo, R.T., Canelo, E.S. & Sinsheimer, R.L. (1969)
DNA of bacteriophage PM2: A closed circular double-stranded molecule.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 63, 1164-1168

Franklin, R.M., Salditt, M. & Silbert, J.A. (1969)
Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage. I. Growth of bacteriophage PM2 and alterations in nucleic acid metabolism in the infected cell.
Virology 38, 627-640

Glynn, I.M. & Chappell, J.B. (1964)
A simple method for the preparation of ^{32}P-labelled adenosine triphosphate of high specific activity.
Biochem. J. 90, 147-149

Goldmark, P.J. & Linn, S. (1970)
An endonuclease activity from Escherichia coli absent from certain rec$^-$ strains.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 67, 434-441

Goldmark, P.J. & Linn, S. (1972)
Purification and properties of the recBC DNase of Escherichia coli K-12.
J. Biol. Chem. 247, 1849-1860

Grossman, L., Braun, A., Feldberg, R. & Mahler, I. (1975)
Enzymatic repair of DNA.
Ann. Rev. Biochem. 44, 19-43

Gudas, L.J. & Pardee, A.B. (1975)
Model for the regulation of Escherichia coli DNA repair functions.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 2330-2334

Gudas, L.J. & Pardee, A.B. (1976)
DNA synthesis inhibition and the induction of protein X in Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 101, 459-477

Gudas, L.J. & Mount, D.W. (1977)
Identification of the recA (tif) gene product of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 5280-5284

Haefner, K. (1968)
Spontaneous lethal sectoring, a further feature of Escherichia coli strains deficient in the function of the rec and uvr genes.
J. Bacteriol. 96, 652-659

Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A.K. & Smith, C.A. (1979)
DNA repair in bacteria and mammalian cells.
Ann. Rev. Biochem. 48, 783-836

Heil, A. & Zillig, W. (1970)
Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription.
FEBS Lett. 11, 165-168

Hendler, R.W., Pereira, M. & Scharff, R. (1975)
DNA synthesis involving a complexed form of DNA polymerase I in extracts of Escherichia coli.
Proc. Natl.Acad. Sci. (USA) 72, 2099-2103

Hermanns, U. & Wackernagel, W. (1977)
The recBC enzyme of Escherichia coli K-12: Premature cessation of catalytic activities in vitro and reactivation by potassium ions.
Eur. J. Biochem. 76, 425-432

Hinnen, R., Schäfer, R. & Franklin, R.M. (1974)
Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage. Preparation of virus and localisation of the structural proteins.
Eur. J. Biochem. 50, 1-14

Horii, T., Ogawa, T. & Ogawa, H. (1980)
Organisation of the recA gene of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 313-317

Howard-Flanders, P. & Theriot, L. (1966)
Mutants of Escherichia coli K-12 defective in DNA repair and genetic recombination.
Genetics 53, 1137-1150

Karu, A.E. & Linn, S. (1972)
Uncoupling of the recBC ATPase from DNase by DNA cross-linked with psoralen.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 2855-2859

Karu, A.E., McKay, V., Goldmark, P.J. & Linn, S. (1973)
The recBC deoxyribonuclease of Escherichia coli K-12: Substrate specificity and reaction intermediates.
J. Biol. Chem. 248, 4874-4884

Kenyon, C.J. & Walker, G.C. (1980)
DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 2819-2823

Konrad, E.B. (1977)
Method for the isolation of Escherichia coli mutants with enhanced recombination between chromosomal duplications.
J. Bacteriol. 130, 167-172

Kornberg, A. (1974)
"DNA synthesis", Freeman (San Francisco)

Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685

Lehman, I.R. & Nussbaum, A.L. (1964)
The deoxyribonucleases of Escherichia coli. V. On the specificity of exonuclease I (phosphodiesterase)
J. Biol. Chem. 239, 2628-2636

Lehmann, A.R. & Bridges, B.A. (1977)
DNA repair. In: Essays in biochemistry (P.N. Campbell & W.N. Aldridge, eds.), Vol. 13, pp. 71-119; Academic Press, New York

Lieberman, R.P. & Oishi, M. (1974)
The recBC deoxyribonuclease of Escherichia coli : Isolation and characterisation of the subunit proteins of the enzyme.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 4816-4820

Little, J.W. (1967)
An exonuclease induced by bacteriophage λ. II. Nature of the enzymatic reaction.
J. Biol. Chem. 242, 679-686

Little, J.W. & Kleid, D. (1977)
Escherichia coli protein X is the recA gene product.
J. Biol. Chem. 252, 6251-6252

Little, J.W., Edmiston, S.M., Pacelli, L.Z. & Mount, D.W. (1980)
Cleavage of the Escherichia coli lexA protein by the recA protease.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 3225-3229

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin-Phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

Marinus, M.G. & Morris, N.R. (1974)
Biological function for 6-methyladenine residues in the DNA of Escherichia coli K-12.
J. Mol. Biol. 85, 309-322

Marsden, H.S., Pollard, E.C., Ginoza, W. & Randall, E.P. (1974)
Involvement of recA and exr genes in the in vivo inhibition of the recBC nuclease.
J. Bacteriol. 118, 465-470

Masamune, Y., Fleischmann, R.A. & Richardson, C.C. (1971)
Enzymatic removal and replacement of nucleotides at the single-strand breaks in deoxyribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 246, 2680-2691

Mazin, A.L., Sulimova, G.E. & Vanyushin, B.F. (1974)
Granulated hydroxyapatite: preparation and chromatographic properties.
Analytical Biochem. 61, 62-71

McDonell, M.W., Simon, H.N. & Studier, F.W. (1977)
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.
J. Mol. Biol. 110, 119-146

McEntee, K., Hesse, J.E. & Epstein, W. (1976)
Identification and radiochemical purification of the recA protein of Escherichia coli K-12.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 3979-3983

McEntee, K. (1977)
Protein X is the product of the recA gene of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 5275-5279

McEntee, K., Weinstock, G.M. & Lehman, I.R. (1979)
Initiation of general recombination catalyzed in vitro by the recA protein of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 2615-2619

McKay, V. & Linn, S. (1974)
The mechanism of degradation of duplex deoxyribonucleic acid by the recBC enzyme of Escherichia coli K-12.
J. Biol. Chem. 249, 4286-4294

McKay, V. & Linn, S. (1976)
Selective inhibition of the DNase activity of the recBC enzyme by the DNA binding protein from Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 251, 3716-3719

McPartland, A., Green, L. & Echols, H. (1980)
Control of recA gene RNA in E. coli: regulatory and signal genes.
Cell 20, 731-737

Melgar, E. & Goldthwait, D. (1968)
Deoxyribonucleic acid nucleases. II. The effects of metals on the mechanism of deoxyribonuclease I.
J. Biol. Chem. 243, 4409-4416

Molineux, I.J., Friedman, S. & Gefter, M.L. (1974)
Purification and properties of the Escherichia coli deoxyribonucleic acid- unwinding protein.
J. Biol. Chem. 249, 6090-6098

Monk, M. & Kinross, J. (1972)
Conditional lethality of recA and recB derivatives of a strain of Escherichia coli K-12 with a temperature -sensitive deoxyribonucleic acid polymerase I.
J. Bacteriol. 109, 971-978

Moody, E.M., Low., K.B. & Mount, D.W. (1973)
Properties of strains of Escherichia coli K-12 carrying mutant lex and rec alleles.
Mol. Gen. Genet. 121, 197-205

Ogawa, T., Wabiko, H., Tsurimoto, T., Horii, T., Masukata, H. & Ogawa, H. (1978)
Characteristics of purified recA protein and the regulation of its synthesis in vivo.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 909-915

Oishi, M. (1969)
An ATP-dependent deoxyribonuclease from Escherichia coli with a possible role in genetic recombination.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 64, 1292-1299

Oishi, M. & Smith, C.L. (1978)
Inactivation of phage repressor in a permeable cell system: role of recBC DNase in induction.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 3569-3573

Panet, A., van de Sande, I.H., Loewen, P.C., Khorana, H.G., Raae, A.J., Lillehaug, J.R. & Kleppe, K. (1973)
Physical characterisation and simultaneous purification of bacteriophage T4 induced polynucleotide kinase, polynucleotide ligase, and deoxyribonucleic acid polymerase.
Biochemistry 12, 5045-5050

Pollard, E.C. & Achey, P.M. (1975)
Induction of radioresistance in Escherichia coli.
Biophys. J. 15, 1141-1154

Prell, A. (1977)
In vitro- Untersuchungen zur Kontrolle der recBC- abhängigen DNA-Degradierung in Escherichia coli nach UV-Bestrahlung.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität (Bochum)

Ptashne, M., Backman, K., Humayun, M.Z., Jeffrey, A., Maurer, R., Meyer, B. & Sauer, R.T. (1976)
Autoregulation and function of a repressor in bacteriophage lambda.
Science 194, 156-161

Radding, C.M. (1971)
The purification of β protein and exonuclease made by phage λ .
Methods Enzymol. 21 D , 273-280

Radding, C.M, & Carter, D.M. (1971)
The role of exonuclease and β protein of phage λ in genetic recombination. III. Binding to deoxyribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 246, 2513-2518

Radding, C.M. (1973)
Molecular mechanisms in genetic recombination.
Ann. Rev. Genet. 7, 87-111

Radding, C.M. (1978)
Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair.
Ann. Rev. Biochem. 47, 847-880

Ray, D.S. & Schekman, R.W. (1969)
Replication of bacteriophage M13. I. Sedimentation analysis of crude lysates of M13- infected bacteria.
Biochim.Biophys. Acta 179, 398-407

Richardson, C.C. & Kornberg, A. (1964)
A deoxyribonucleic acid phosphatase-exonuclease from Escherichia coli. I. Purification of the enzyme and characterisation of the phosphatase activity.
J. Biol. Chem. 239, 242-250

Riggs, A.D., Suzuki, H. & Bourgeois, S. (1970)
lac repressor-operator interaction. I. Equilibrium studies.
J. Mol. Biol. 48, 67-83

Roberts, J.W. & Roberts, C.W. (1975)
Proteolytic cleavage of bacteriophage lambda repressor in induction.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 147-151

Roberts, J.W., Roberts, C.W. & Craig, N.L. (1978 a)
Escherichia coli recA gene product inactivates phage repressor.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 4714-4718

Roberts, J.W., Roberts, C.W., Craig, N.L. & Phizicky,E.M. (1978 b)
Activity of the Escherichia coli recA gene product.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 917-920

Rosamond, J., Telander, K.M. & Linn, S. (1979)
Modulation of the action of the recBC enzyme of Escherichia coli K-12 by Ca^{2+}.
J. Biol. Chem. 254, 8646-8652

Rupp, W.D., Wilde III, C.E., Reno, D.L. & Howard-Flanders, P. (1971)
Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated cells.
J. Mol. Biol. 61, 25-44

Sancar, A., Stachelek, C., Konigsberg, W. & Rupp, W.D. (1980)
Sequences of the recA gene and protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 2611-2615

Satta, G., Gudas, L.J. & Pardee, A.B. (1979)
Degradation of Escherichia coli DNA: evidence for limitation in vivo by protein X, the recA gene product.
Molec. Gen. Genet. 168, 69-80

Sedgwick, S.G. (1975)
Ultraviolet inducible protein associated with error prone repair in E. coli B.
Nature 255, 349-350

Shibata, T., DasGupta, C., Cunningham, R.P. & Radding, C.M. (1979 a)
Purified E. coli recA protein catalyzes homologous pairing of superhelical DNA and single-stranded fragments.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 1638-1642

Shibata, T., Cunningham, R.P., DasGupta, C. & Radding, C.M. (1979 b)
Homologous pairing in genetic recombination: complexes of recA protein and DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 5100-5104

Sigal, N., Delius, H., Kornberg, T., Gefter, M.L & Alberts, B. (1972)
A DNA-unwinding protein isolated from Escherichia coli: its interaction with DNA and with DNA polymerases.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 3537-3541

Susskind, M.M. & Botstein, D. (1978)
Molecular genetics of bacteriophage P22.
Microbiol. Rev. 42, 385-413

Sutton, W.D. (1971)
A crude nuclease preparation suitable for use in DNA reassociation experiments.
Biochim. Biophys. Acta 240, 522-531

Tomizawa, J. I. & Ogawa, H. (1972)
Structural genes of ATP-dependent deoxyribonuclease of Escherichia coli.
Nature New Biol. 239, 14-16

Vogt, V.M. (1973)
Purification and further properties of single-strand specific nuclease from Aspergillus oryzae.
Eur. J. Biochem. 33, 192-200

Wackernagel, W. & Hermanns, U. (1974)
Inhibition of exonuclease V after infection of E. coli by bacteriophage T7.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 521-527

Weiner, J.M., Bertsch, L.L. & Kornberg, A. (1975)
The deoxyribonucleic acid unwinding protein of Escherichia coli: properties and functions in replication.
J. Biol. Chem. 250, 1972-1980

Weinstock, G.M., McEntee, K. & Lehman, I.R. (1979)
ATP-dependent renaturation of DNA catalyzed by the recA protein of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 126-130

Weiss, B., Jaquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C. & Richardson, C.C. (1968)
Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4.
J. Biol. Chem. 243, 4543-4555

West, S.C., Cassuto, E., Mursalim, J. & Howard-Flanders, P. (1980)
Recognition of duplex DNA containing single-stranded regions by recA protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 2569-2573

Whitehead, E.P., Palitti, F., Cerio-Ventura, G., Vellante, A. & Fassella, P.M. (1979)
DNA-dependent ATPases and viceversa.
in "Macromolecules in the functioning cell", pp. 159-185, eds. F. Salvatore , G. Marino & P. Volpe,
Plenum Publishing Corporation, New York

Wilcox, K.W. & Smith, H.O. (1976)
Binding of the ATP-dependent DNase from Haemophilus influenzae to duplex DNA molecules.
J. Biol. Chem. 251, 6122-6126

Willets, N.S. & Clark, A.J. (1969)
Characteristics of some multiply recombination-deficient strains of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 100, 231-239

Winder, F.G. & Sastry, P.A. (1971)
The formation of a long-lived complex between an ATP--dependent deoxyribonuclease and DNA.
FEBS Lett. 17, 27-30

Witkin, E.M. (1976)
Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli.
Bacteriol. Rev. 40, 869-907

Wright, M., Buttin, G. & Hurwitz, J. (1971)
The isolation and characterisation from Escherichia coli of an adenosine triphosphate-dependent deoxyribonuclease directed by recB,C genes.
J.Biol. Chem. 246, 6543-6555

Wu, R. & Tailor, E. (1971)
Nucleotide sequence analysis of DNA. II. Complete nucleotide sequence of the cohesive ends of bacteriophage λ DNA.
J. Mol. Biol. 57, 491-511

Youngs, D.A. & Bernstein, I.A. (1973)
Involvement of the recB recC nuclease (exonuclease V) in the process of X-ray-induced deoxyribonucleic acid degradation in radiosensitive strains of Escherichia coli K-12.
J. Bacteriol. 113, 901-906

Youngs, D.A. & Smith, K.C. (1976)
Genetic control of multiple pathways of post-replicational repair in uvrB strains of Escherichia coli K-12.
J. Bacteriol. 125, 102-110

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. W. Wackernagel angefertigt. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas und für viele wertvolle Ratschläge zur Durchführung und Abfassung der vorliegenden Arbeit. Mein besonderer Dank gilt auch dem Evangelischen Studienwerk Villigst, das mich während der Anfertigung dieser Arbeit als Stipendiat betreute. Herrn Prof. Dr. U. Winkler danke ich, daß er mir die Möglichkeit zur Promotion an seinem Lehrstuhl gab, sowie für seine stete Unterstützung.

Ich möchte auch all denen danken, die durch Bereitstellung von Material und Mitteilung ihrer unveröffentlichten experimentellen Ergebnisse zur Durchführung der Arbeit beigetragen haben. Ich danke Dr. B. Dreiseikelmann für Enzym- und DNA-Proben, Dr. G. M. Weinstock für den E. coli Stamm KM1842 und Dr. S. Linn für den Bakteriophagen PM2 und Ratschläge zu seiner Anzucht. Dr. C. M. Radding danke ich für die Mitteilung experimenteller Daten vor Publikation und Dr. E. Cassuto und Dr. S. West für eine Probe gereinigten recA Proteins und ebenfalls für experimentelle Daten.

Mein Dank gilt auch Herrn Dipl.-Ing. A. Hahn und Frl. B. Thoms für ihre freundliche Unterstützung.

Lebenslauf

21. 7. 1952	geboren in Essen
1959 - 1963	Besuch der Wilhelmschule in Essen
1963 - 1971	Besuch der Luisenschule, Mädchengymnasium, in Essen
1971	Reifeprüfung
Okt. 1971	Immatrikulation an der Ruhr-Universität Bochum für das Fach Biologie
1974	Diplomvorprüfung
Feb. 1977	Diplomhauptprüfung
	Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie und anorg. Chemie Diplomarbeit: "In vitro- Untersuchungen zur Kontrolle der recBC-abhängigen DNA-Degradierung in Escherichia coli nach UV-Bestrahlung."
	Anschließend Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen

Schriftenverzeichnis

W. Wackernagel, K. Seroka, B. Dreiseikelmann, A. Prell (1976)
Infectivity of various forms of T7 DNA.
In: Modern Trends in Bacterial Transformation and Transfection,
A. Portolés, R. Lopéz, M. Espinoza, eds., pp. 185-192
Elsevier/North-Holland Biomedical Press-Amsterdam

A. Prell, W. Wackernagel (1977)
Degradation *in vitro* of gapped circular DNA by the *recBC*
DNase from *Escherichia coli*.
Lunteren Lectures on Molecular Genetics: "DNA Processing
in the Procaryotic Cell", Lunteren, Abstract

A. Prell, W. Wackernagel (1979)
The action of the *recBC* enzyme of *Escherichia coli* on
linear and circular DNA with gaps.
Frühjahrstagung der Gesellschaft für Biologische Chemie,
Gesellschaft für Genetik und Deutsche Gesellschaft für
Zellbiologie, Berlin, Abstract

A. Prell, W. Wackernagel (1980)
Degradation of linear and circular DNA with gaps by the
recBC enzyme of *Escherichia coli*. Effects of gap length
and the presence of cell-free extracts.
Eur. J. Biochem. 105, 109-116

A. Prell, W. Wackernagel
Partial protection by *recA* protein of single-stranded DNA
and no protection of gapped circular DNA against degra-
dation by *recBC* enzyme.
eingereicht 1980

DER DRUCKER - (Alte) Buscheystraße 138 - 4630 Bochum-Querenburg